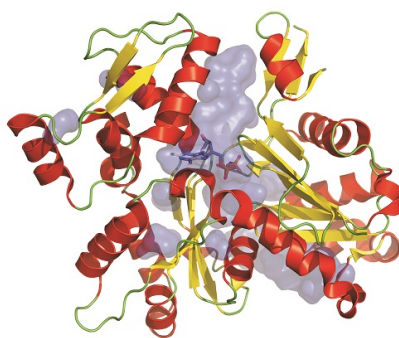


# FALTUNGSSTABILITÄT UND ASSEMBLIERUNGSKINETIK VON AKTINSTRUKTUREN

BIOPHYSIKALISCHE EINFLÜSSE VON DRUCK, TEMPERATUR UND COSOLVENTIEN



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(DR. RER. NAT.)

VORGELEGT VON

**CHRISTOPHER ROSIN**

GEBOREN AM 14. DEZEMBER 1983 IN GELSENKIRCHEN

EINGEREICHT BEI DER

FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND CHEMISCHE BIOLOGIE

der Technischen Universität Dortmund

Dortmund

2015



Veröffentlichung als Dissertation in der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der  
TU Dortmund.

Dissertationsort: Lehrstuhl für Physikalische Chemie I

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2011 bis Mai 2015 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Winter angefertigt.

Prüfungskommission:

Prof. Dr. R. Winter	(Erstgutachter)
Prof. Dr. H. Rehage	(Zweitgutachter)



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst danke ich **Herrn Prof. Dr. Roland Winter** für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen. Zudem möchte ich mich für die Betreuung während der Promotionszeit und die stetige Diskussionsbereitschaft bedanken. Weiterhin bedanke ich mich für die spannenden Projekte sowie Kollaborationen.

**Herrn Prof. Dr. Heinz Rehage** danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Bei **Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik** bedanke ich mich für seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

**Frau Andrea Kreusel** danke ich für die Hilfe bei allen organisatorischen und administrativen Tätigkeiten sowie für die angenehme Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei **allen Mitarbeitern sowie ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls Physikalische Chemie I** für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Leitern der Feinmechanik- und Elektronikwerkstatt, **Herrn Holger Konopka** und **Herrn Ralf Maserski**, sowie deren Mitarbeitern, für die technische Umsetzung einer Vielzahl meiner Ideen und die Behebung

verschiedenster mechanischer und elektrischer Probleme bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau **Dr. Ulrike Hinssen** für ihr außerordentliches Engagement für meine Arbeit.

Ich bedanke mich ebenfalls bei **Prof. Dr. Stefan Raunser** für die Kollaborationsmöglichkeit und bei **M.Sc. Julian von der Ecken** für die praktische Durchführung von TEM-Messungen sowie seine stetige Hilfsbereitschaft.

Der Masterstudentin **M.Sc. Jessika Hälker**, den Bachelorstudenten **B.Sc. Paul Hendrik Schummel** sowie **B.Sc. Katharina Kettler** und dem Vertiefungspraktikanten **B.Sc. Dennis Vogelsang** danke ich herzlich für die konstruktive und zielführende Zusammenarbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei meinem Freund und Bürokollegen **Dr. Sebastian Grobleny** für zahlreiche fachliche Diskussionen sowie für die sehr gute Zusammenarbeit.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinem alten Freund, Gefährten und Bürokollegen **Dr. Mirko Erlkamp** für seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Großer Dank gebührt der Familie meiner Verlobten, die mich von Beginn meines akademischen Weges an unterstützt und bestärkt hat. Ich bedanke mich besonders bei **Gabriele** und **Waldemar**.

Ich bedanke mich herzlich bei **meinen Eltern**, die mich in meinem Leben immer unterstützt haben und für ihren Rückhalt.

Mein größter Dank gilt meiner Verlobten, **Adriane Kutter**, für ihr uneingeschränktes Vertrauen in mich, ihre Unterstützung und vor allem für ihre Geduld.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Aktin . . . . .	6
1.1.1 G-Aktin . . . . .	7
1.1.2 Die Polymerisationsreaktion . . . . .	9
1.1.3 Aktinfilamente und Aktinbündel . . . . .	11
1.2 Faltungsstabilität von Proteinkonformationen . . . . .	14
1.2.1 Einflüsse von Temperatur, Druck, Cosolventien und Crowding .	17
<b>2 Etablierung eines Hochdruckmesssystems</b>	<b>23</b>
2.1 Einleitung und Zielsetzung . . . . .	23
2.2 Etablierung eines Hochdruckmikroskopie- und Spektroskopie- systems basierend auf der Diamantstempeltechnik . . . . .	24
2.2.1 Material und Methoden . . . . .	24
2.2.2 Diacell <sup>®</sup> VivoDAC - Eine membrangetriebene Diamantstempel- zelle . . . . .	27
2.2.3 Implementierung eines modularen Fluoreszenzspektrometers in ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop . . . . .	31
2.2.4 FluoSpheres <sup>®</sup> als interner Druckindikator . . . . .	37
2.2.5 Automatisierung von Druckexperimenten . . . . .	43
2.2.6 Testmessungen des Hochdruckmesssystems . . . . .	49
2.2.7 Zusammenfassung und Schlussfolgerung . . . . .	52

<b>3</b>	<b>Faltungsstabilität von Aktinstrukturen</b>	<b>55</b>
3.1	Einleitung und Zielsetzung . . . . .	55
3.2	<b>Untersuchungen der Stabilitätsgrenzen von G-Aktin und Aktin-Suprastrukturen</b> . . . . .	58
3.2.1	Material und Methoden . . . . .	58
3.2.2	Temperatur- und Druckeffekte auf monomeres, filamentöses und gebündeltes Aktin . . . . .	64
3.2.3	Zusammenfassung und Schlussfolgerung . . . . .	92
3.3	<b>Einfluss von Cosolventien auf die Temperatur- und Druckstabilität von Aktinfilamenten</b> . . . . .	97
3.3.1	Material und Methoden . . . . .	97
3.3.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	98
3.3.3	Zusammenfassung und Schlussfolgerung . . . . .	109
<b>4</b>	<b>Assemblierungskinetik von Aktinstrukturen</b>	<b>113</b>
4.1	Einleitung und Zielsetzung . . . . .	113
4.2	<b>Cosolvens- und Crowding-Effekte auf die Polymerisationsreaktion von Aktin</b> . . . . .	115
4.2.1	Material und Methoden . . . . .	115
4.2.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	120
4.2.3	Zusammenfassung und Schlussfolgerung . . . . .	134
4.3	<b>Kombinierte Effekte von Temperatur, Druck und Cosolventien auf die Polymerisationskinetik von Aktin</b> . . . . .	137
4.3.1	Material und Methoden . . . . .	137
4.3.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	140
4.3.3	Zusammenfassung und Schlussfolgerung . . . . .	151
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>XVI</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>XVII</b>

## Kurzfassung

Ein Großteil der Erde ist von Ozeanen bedeckt, die eine durchschnittliche Tiefe von 3800 Metern aufweisen. In dieser Tiefe liegt bereits ein hydrostatischer Druck vor, der etwa dem 380-fachen des Atmosphärendrucks auf der Erdoberfläche entspricht. Mit zunehmender Meerestiefe sinkt die Wassertemperatur unterhalb von 4 °C, in der Nähe hydrothermaler Quellen hingegen steigt diese bis auf über 400 °C an.<sup>[1]</sup> Diese extremen Umweltbedingungen bzgl. des Drucks und der Temperatur hat das Leben nicht davon abgehalten diese Regionen zu erschließen.<sup>[2,3]</sup> Seit der Entdeckung dieser extremophilen Organismen sind Untersuchungen der Strategien, die diese Organismen entwickelt haben, um in diesen außergewöhnlichen Habitaten zu überleben, Gegenstand aktueller Forschung. Des Weiteren wird postuliert, dass Regionen um hydrothermale Quellen optimale Reaktionsbedingungen für die Bildung präbiotischer komplexer Makromoleküle dargestellt haben könnten und somit das Leben an diesen Orten seinen Ursprung gefunden haben könnte.<sup>[4]</sup> Zudem haben Analysen von Tiefseeorganismen ergeben, dass diese mit zunehmender Meerestiefe bzw. zunehmendem hydrostatischen Druck hohe Mengen an natürlichen Osmolyten akkumulieren, die dem osmotischen Druck, der durch das umgebende Salzwasser entsteht, entgegenwirken, sowie die native Konformation von Proteinen und Enzymen unter genannten extremen Umweltbedingungen stabilisieren.<sup>[5,6]</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde zur Realisierung genannter extremer Bedingungen zunächst ein Messsystem etabliert, das die Analyse von Proben innerhalb eines Temperaturbereichs von 1 - 250 °C sowie hydrostatischen Drücken von Atmosphärendruck bis hin zu etwa 16000 bar ermöglicht. Die Kombination verschiedener Analysemethoden, wie die konfokale Laser-Raster- und Phasenkontrastmikroskopie gekoppelt mit der Methodik der Fluoreszenz- und FTIR-(**F**ourier **T**ransform **I**nfrared)-Spektroskopie, stehen hierbei zur Visualisierung und Untersuchung von biomolekularen Prozessen zur Verfügung. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die Habitate extremophiler Organismen bzgl. Temperatur und hydrostatischem Druck imitiert, um Auswirkungen dieser auf ein in eukaryontischen Zellen nahezu ubiquitär vorkommendes Protein, Aktin und seiner supramolekularen Strukturen, zu studieren. Aktin stellt *in vivo* einen wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts dar und ist an unzähligen essentiellen



len Prozessen der Zelle beteiligt. Die Ergebnisse dieser Studien haben u.a. gezeigt, dass die monomere Form dieses Proteins unter genannten extremen Umweltbedingungen kaum in nativer Proteinkonformation vorliegt, hingegen gebildete Aktinfilamente und -bündel eine wesentlich höhere Stabilität bzgl. hoher Drücke und Temperaturen, bedingt durch zusätzliche intramolekulare Wechselwirkungen, aufweisen und durch kompatible Osmolyte, wie Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), weiter stabilisiert werden können. Mehrere Mikrometer lange Aktinfilamente, die einen wesentlichen Teil des Zytoskeletts darstellen, entstehen durch einen komplexen Polymerisationsprozess aus monomeren Einheiten.<sup>[7]</sup> Die Kinetik dieses Prozesses wurde in der vorliegenden Arbeit bzgl. der Sensitivität gegenüber Temperatur und Druck untersucht. Ebenso wurden die Effekte eines kompatiblen Osmolyts, TMAO, und eines natürlich vorkommenden destabilisierenden Osmolyts, Harnstoff, untersucht. Da in der Zelle etwa 30 % des Volumens von Makromolekülen eingenommen werden,<sup>[8]</sup> wurden diese Bedingungen *ex vivo* durch den Einsatz eines makromolekularen Crowders (Dextran) dargestellt. Durch diese Analysen konnten, die von Temperatur, Druck sowie Osmolyten und eines makromolekularen Crowders maßgeblich beeinflussten Subprozesse des Polymerisationsprozesses, identifiziert werden. Beispielsweise führte die Gegenwart von TMAO oder Dextran sowie eine Temperaturerhöhung bis hin zu 40 °C zu einer drastischen Beschleunigung des Polymerisationsprozesses, wobei die Geschwindigkeitskonstanten der Nukleationsreaktion um mehrere Größenordnungen anstiegen. Im Gegensatz hierzu wiesen die Gegenwart von Harnstoff und die Applikation hoher Drücke bis zu 2000 bar einen retardierenden Effekt bzgl. der Kinetik des Nukleationsschritts auf.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien haben weitere wichtige und detaillierte Erkenntnisse bzgl. der Faltungsstabilität von Aktin und Aktinsuprastrukturen in An- und Abwesenheit von natürlichen Osmolyten aufgezeigt. Des Weiteren zeigen kinetische Analysen der Polymerisationsreaktion von Aktin, dass diese eine hohe Sensitivität gegenüber der Temperatur, Druck sowie der Gegenwart von natürlichen Osmolyten und makromolekularen Crowdern aufweist. Die erhaltenen Ergebnisse können in Zukunft im Kontext Aktin-basierter Prozesse *in vivo* und der Stabilität des Zytoskeletts unter extremen Umweltbedingungen sowie bei der Interpretation der Mechanismen von intrazellulären Assemblierungsreaktionen berücksichtigt werden.

## Abstract

The largest portion of Earth is covered by the oceans exhibiting an average depth of 3800 meters, yielding a hydrostatic pressure which is about the 380-fold compared to atmospheric pressure of Earth's surface. With increasing depth, the temperature of the sea decreases below 4°C, but in contrast to that there are also hydrothermal vents holding temperatures beyond 400 °C.<sup>[1]</sup> These extreme environmental conditions have not prevented life from invading deep sea regions.<sup>[2,3]</sup> Since the first discovery of extremophilic organisms researchers try to investigate the strategies enabling life under these extreme environmental conditions. Furthermore, high pressure and high temperature conditions, as found close to hydrothermal vents, are proposed to exhibit optimal reaction parameters for assembly of complex prebiotic macromolecules and therefore are thought to be a possible place where life has its origin.<sup>[4]</sup> Moreover, investigations of deep-sea organisms depicted that these organisms accumulate high concentrations of natural osmolytes with increasing depth, which are able to compensate the osmotic pressure and also stabilize the native state of proteins and enzymes under these extreme environmental conditions.<sup>[5,6]</sup> In order to realize such conditions in the laboratory, first of all, a measuring system enabling the investigation of a sample in a temperature range of 1-250 °C and hydrostatic pressures up to 16000 bar, was established in the present work. The combination of various analysis methods as confocal laser scanning and phase contrast microscopy coupled to fluorescence and FTIR (**F**ourier **T**ransform **I**nfrared) spectroscopic methods, provide the visualization and investigation of biomolecular processes in the established measuring system. During the further course of this work the natural habitats of extremophiles were mimicked concerning temperature and hydrostatic pressure for the purpose of studying the effect of extreme environmental conditions on actin and its suprastructures. Actin, which is almost ubiquitary in eukaryotes, depicts a major part of the cytoskeleton and is involved in a myriad of intracellular processes. The results of these studies clearly show that the monomeric state of the protein is hardly able to withstand extreme environmental conditions usually found in deep-sea habitats. On the contrary, actin filaments and bundles exhibit significantly higher temperature and pressure stabilities due to additional intramolecular

interactions compared to the monomeric state and could be further stabilized by the addition of natural osmolytes such as TMAO. Actin filaments, which are up to several micrometers in length, are a major part of the cytoskeleton. These filaments arise from a complex polymerization reaction starting with the assembly of monomeric actin into small nuclei followed by an elongation process.<sup>[7]</sup> Further projects of the present work deal with the effects of temperature and pressure on the kinetics of the polymerization reaction of actin. The influence of a compatible osmolyte, TMAO, and a physiological destabilizing osmolyte, urea, on the assembly process of actin filaments was studied as well. The physiological intracellular concentration of macromolecules is 30 % by volume.<sup>[8]</sup> In order to mimick these conditions, dextran, a macromolecular crowding agent was used. The relevant subprocesses of the polymerization reaction, which are mainly affected by temperature, pressure as well as by the presence of osmolytes and the macromolecular crowding agent, could be identified. The presence of TMAO or dextran just as an increase of temperature up to 40 °C led to a drastical acceleration of the polymerization reaction, at which the rate constants of the nucleation process were increased over several orders of magnitude, e.g. In contrast, the presence of urea as well as an increase of pressure up to 2000 bar resulted in significantly decreased rate constants of the nucleation reaction.

The conducted studies of the present work exhibit further important and detailed conclusions concerning the folding stability of actin and its suprastructures in the presence or absence of natural osmolytes. Furthermore the kinetic studies of the polymerization process of actin revealed the high sensitivity to temperature, pressure, the presence of osmolytes and under crowded conditions. The obtained results should be taken into account in any context of actin-based processes *in vivo* and the stability of the cytoskeleton under extreme environmental conditions as well as in the interpretation of the mechanisms of intracellular protein assembly reactions.

# 1 Einleitung

Die Entdeckung piezo-, psychro-, und thermophiler Organismen, dessen natürliche Habitate von hohen Drücken und / oder tiefen bzw. sehr hohen Temperaturen geprägt sind, hat Forscher dazu veranlasst, die Überlebensstrategien dieser Organismen zu studieren.<sup>[9]</sup> Terrestrische Habitate, die einen Druck von etwa 1 bar aufweisen, stellen weniger als 1 % der Biosphäre auf der Erde dar.<sup>[10]</sup> Ungefähr 70 % der Erdoberfläche sind von Ozeanen bedeckt, wobei die durchschnittliche Tiefe ~3800 m beträgt. Somit herrscht in den Ozeanen ein durchschnittlicher Druck von ~380 bar.<sup>[11]</sup> Der Marianengraben mit einer Tiefe von ~11000 m weist an der tiefsten Stelle einen Druck von ~1100 bar auf, was etwa dem 1100-fachen Druck der Erdoberfläche entspricht. Sowohl der Marianengraben, als auch hydrothermale Quellen (Tiefseegebiete mit vulkanischer Aktivität) mit Temperaturen über 100 °C, stellen für extremophile Organismen natürliche Habitate dar. So wurde in einer Tiefe von 11000 m ein piezophiles Bakterium entdeckt, das bei einem Druck von 800 bar höchste Wachstumsraten aufzeigt.<sup>[2]</sup> In der Nähe eines „Schwarzen Rauchers“ mit einer Wassertemperatur von 121 °C, konnte ebenfalls ein hyperthermophiler Organismus gefunden werden.<sup>[3]</sup>

Die beiden physikalischen Parameter hydrostatischer Druck und Temperatur weisen eine hohe Effizienz auf, chemische Gleichgewichte und Reaktionsgeschwindigkeiten zu modifizieren, sodass geeignete Messsysteme benötigt werden, um genannte extreme Lebensbedingungen experimentell zu simulieren und die Möglichkeit eröffnen, biologische Proben unter habitatsähnlichen Bedingungen zu studieren. Des Weiteren stellt Druck neben der Temperatur einen Parameter dar, der einen relativ milden Einfluss auf Moleküle aufweist. So entspricht die benötigte Energie um 1 L Wasser von 1 bar auf einen Druck von 4000 bar zu erhöhen (bei  $T = 20\text{ °C}$ ) etwa derselben Energie, die benötigt wird, um die Temperatur von 1 L Wasser von 20 auf 25 °C zu erhöhen (bei  $p = 1\text{ bar}$ ).<sup>[10]</sup>

So konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass unter Einsatz hoher Drücke Proteine nicht nur denaturiert, sondern auch Populationen an Konformationsintermediaten stabilisiert werden, die unter Verwendung der Temperatur als physikalischen Parameter nicht generiert werden können.<sup>[11–13]</sup> Somit kann Druck als wichtiger physikalischer Parameter dienen, um ein tieferes thermodynamisches und kinetisches Verständnis biomolekularer Prozesse zu erhalten. Im Falle des Zytoskeletts von eukaryontischen Zellen, dessen Hauptbestandteile Mikrofilamente (Aktinfilamente), Intermediärfilamente und Mikrotubuli darstellen, die zusammen als Gerüst der Zelle physikalische und strukturelle Stabilität verleihen, aber auch an der Vermittlung von großräumigen Reorganisationen, Beweglichkeit der Zelle, Antwort auf Stressbedingungen, Zellteilung oder intrazellulärem Transport beteiligt sind, konnte gezeigt werden, dass eine einzigartige Kombination aus Stabilität und Dynamik, physikalischer Rigidität und Flexibilität für die Funktionsweise nötig sind.<sup>[14]</sup> Eine Veränderung der nativen dreidimensionalen Proteinkonformation, z.B. auf Genebene durch Punktmutationen, kann zu schwerwiegenden Erkrankungen führen.<sup>[15]</sup> So kann eine Mutation in den für Aktin codierenden Genloci zu Myopathien der glatten oder der Herzmuskulatur führen.<sup>[16,17]</sup> Ein tieferes Verständnis der Struktur, Stabilität und Dynamik dieses Proteins und seiner Suprastrukturen kann somit auch von essentieller Bedeutung für das Verständnis assoziierter Krankheiten sein.

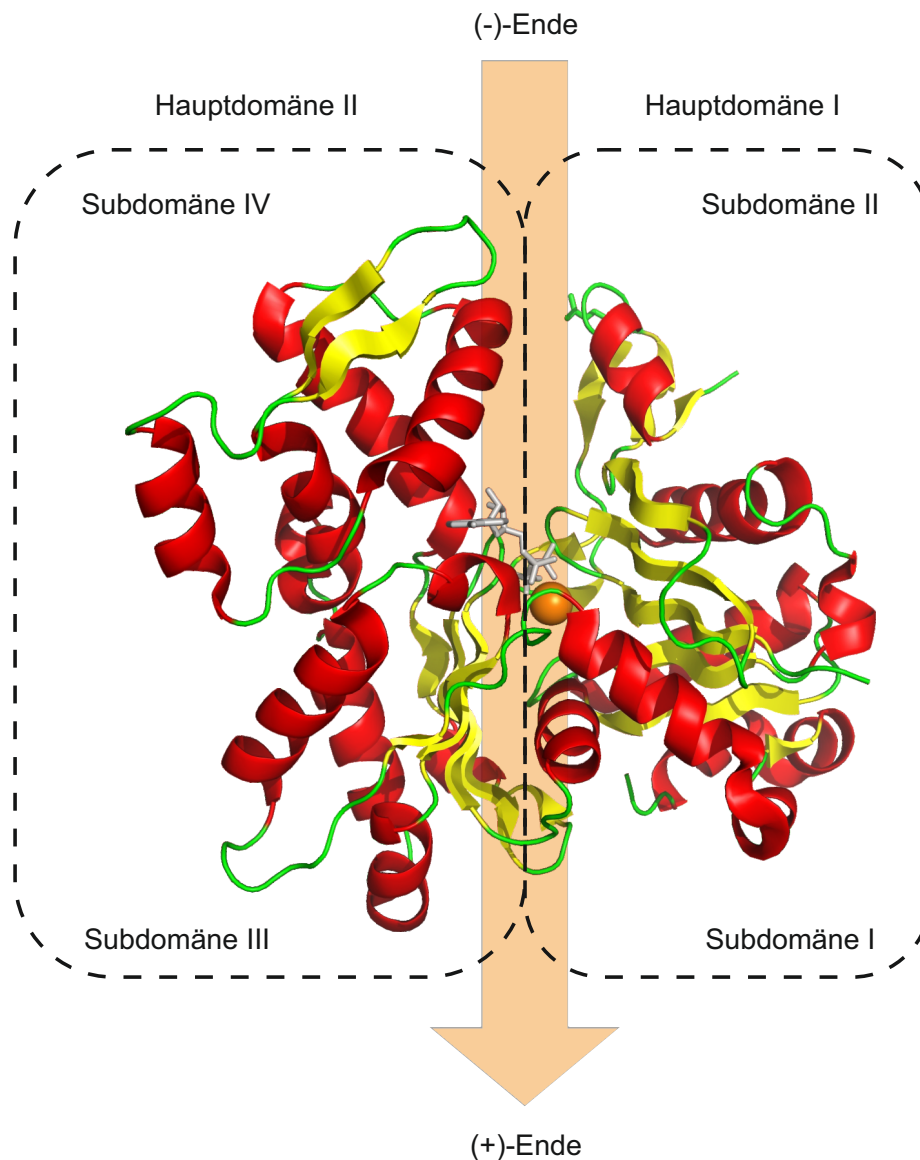
## 1.1 Aktin

Das Leben auf der Erde entstand durch divergente Evolution eines gemeinsamen Vorfahren vor etwa 3 Milliarden Jahren.<sup>[18,19]</sup> Unter den Genen dieses gemeinsamen Vorfahren war bereits das ursprüngliche für Aktin codierende Gen vorhanden.<sup>[20]</sup> Die erste experimentelle Beschreibung eines Proteins, das Myosin „koagulierte“, geht auf W. D. Halliburton im Jahre 1887 zurück,<sup>[21]</sup> der seine Ergebnisse allerdings nicht weiter präzisiert hat, sodass die Entdeckung und Charakterisierung des eukaryontischen Aktins in Muskelzellen in den 1940er Jahren auf Brunó Ferenc Straub zurückgeführt wird.<sup>[22]</sup> Aktin, ein globuläres Protein (G-Aktin; G = globulär), besitzt die Fähigkeit, über einen Selbstassemblierungsprozess zu filamentösen Strukturen zu polymerisieren.<sup>[23–25]</sup> Diese

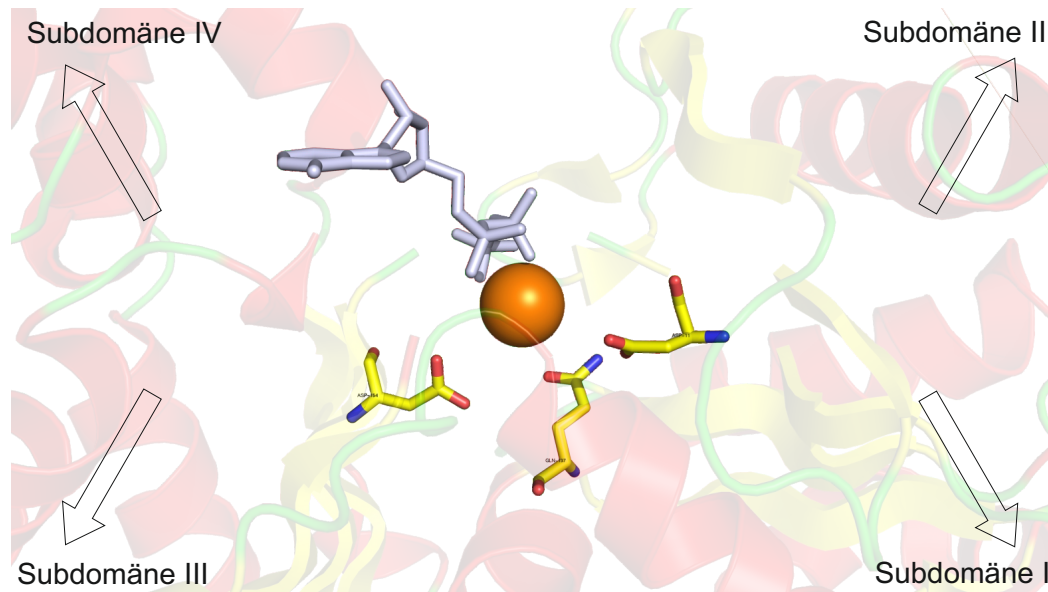
filamentösen Strukturen (F-Aktin; F = filamentös) können im Komplex mit weiteren Proteinen (ABP = Aktin-bindende Proteine) Netzwerke bilden oder zu Bündeln zusammengelagert werden und stellen einen wesentlichen Bestandteil des eukaryontischen Zytoskeletts von Zellen dar.<sup>[7,26–30]</sup> F-Aktin ist an unzähligen intrazellulären Prozessen beteiligt, wie beispielsweise der Muskelkontraktion, der Vermittlung von mechanischer Stabilität der Zelle, bei Zelladhäsionsvorgängen, der Zellbewegung, bei Signalweiterleitungsprozessen, bei intrazellulären Transportvorgängen und bei der Zytokinese von Zellen.<sup>[31]</sup> Bei dieser Vielzahl an Vorgängen sind mehr als 150 Aktin-bindende Proteine beteiligt, die die Reorganisation von Aktinstrukturen vermitteln können.<sup>[32]</sup> Die Aminosäuresequenz von Aktin ist eine der höchstkonserviertesten der Proteine und wurde in der Evolutionsgeschichte nur wenig verändert.<sup>[33]</sup> Weiterhin ist der Gehalt an Aktin in eukaryontischen Zellen relativ hoch: In Muskelzellen beträgt der Anteil an Aktin etwa 20 % bezogen auf die gesamte Proteinmasse und in anderen Zellen zwischen 1 - 5 %.<sup>[34]</sup> Des Weiteren ist Aktin in eukaryontischen Zellen nahezu ubiquitär vorhanden und komplementiert zwei weitere polymere Strukturen, Mikrotubuli und Intermediärfilamente, die zusammen das Zytoskelett darstellen.<sup>[35]</sup>

### 1.1.1 G-Aktin

Im humanen Genom existieren sechs Gene für Aktin, die für drei Gruppen von Isoformen des Proteins codieren:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin.<sup>[36]</sup> Vier Isoformen sind muskelspezifisch ( $\alpha$ : Skelett-, Herz- und glatte Muskulatur) und zwei Isoformen ( $\beta$  und  $\gamma$ ) sind strukturell und funktionell mit dem Zytoskelett anderer Zellen assoziiert.<sup>[37]</sup>  $\alpha$ -Aktin aus Skelettmuskeln besteht aus 375 Aminosäuren, weist eine molekulare Masse von 42 kDa auf, hat eine Größe von  $6.7 \times 4.0 \times 3.4$  nm und einen Gyrationradius von  $22.3 \text{ \AA}$ .<sup>[38–40]</sup> Die Isoformen von Aktin unterscheiden sich in nur wenigen Aminosäuren und weisen allesamt eine ATPase-Aktivität und die Fähigkeit auf, filamentöse Strukturen auszubilden.<sup>[41,42]</sup> Die Proteinstruktur von G-Aktin kann in zwei Hauptdomänen unterteilt werden, die wiederum jeweils in zwei weitere Subdomänen aufgegliedert werden. Inmitten der beiden Hauptdomänen befindet sich eine Nukleotidbindungstasche, in der ein Adenosinphosphat im Komplex mit  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  gebunden werden kann (Abb. 1.1 und 1.2).<sup>[43]</sup>



**Abbildung 1.1:** 3D-Bändermodell von G-Aktin. Im Zentrum des Proteins liegt die Nukleotidbindungstasche in der ATP (grau) im Komplex mit  $\text{Ca}^{2+}$  (orange) gebunden ist. Die Struktur von G-Aktin weist eine große Domäne (Hauptdomäne II) und eine kleinere Domäne (Hauptdomäne I) auf, die über die Nukleotidbindungstasche bzw. Gelenkregion miteinander verbunden sind. Aufgrund der Polarität des Proteins werden die beiden Hauptdomänen in vier weitere Subdomänen unterteilt. Hierbei bilden Subdomäne I + III das sogenannte (+)-Ende und Subdomäne II + IV das (-)-Ende. Bei der Polymerisationsreaktion von G- zu F-Aktin ist die Assoziationsreaktion von Monomeren an das (+)-Ende wesentlich schneller als an das (-)-Ende. Das 3D-Bändermodell wurde mittels „The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.“<sup>[44]</sup> basierend auf der Kristallstruktur 3HBT<sup>[45]</sup> dargestellt.



**Abbildung 1.2:** Nukleotidbindungstasche von G-Aktin. Dargestellt ist ATP (grau) im Komplex mit  $\text{Ca}^{2+}$  (orange) und die an der Bindung des Calcium-Ions beteiligten Aminosäuren des Proteins. An der Bindung beteiligte Wassermoleküle sind nicht eingezeichnet. Die Visualisierung erfolgte mittels „The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.“<sup>[44]</sup> basierend auf der Kristallstruktur 3HBT.<sup>[45]</sup>

Fluoreszenzspektroskopische Studien haben gezeigt, dass die Bindungstasche des Proteins eine höhere Bindungsaffinität zu  $\text{Mg}^{2+}$  im Vergleich zu  $\text{Ca}^{2+}$  aufweist.<sup>[46,47]</sup> Die Affinität von Mg-G-Aktin zu ATP ist ebenfalls höher im Vergleich zu Ca-G-Aktin.<sup>[48]</sup> Die Konformation von G-Aktin ist sehr dynamisch und flexibel und verändert sich in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustandes des gebundenen Adenosinphosphates (ATP, ADP) und Kations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ).<sup>[45,49–52]</sup> Ebenso adaptiert Aktin verschiedene strukturelle Zustände im Komplex mit unterschiedlichen Aktin-bindenden Proteinen.<sup>[27,53,54]</sup> Die hohe Flexibilität der Proteinstruktur wird vermutlich benötigt, um mit einer Vielzahl von Interaktionspartnern wechselwirken und ebenso um zu Aktinfilamenten polymerisieren zu können.<sup>[25,51,55–59]</sup>

### 1.1.2 Die Polymerisationsreaktion

Die G-zu-F-Transformation oder Polymerisationsreaktion von Aktin beschreibt den Selbstassemblierungsprozess von Aktinmonomeren zu Aktinfilamenten. Die Energie für diesen Prozess wird in Form von ATP oder ADP bereitgestellt. Der erste Schritt der



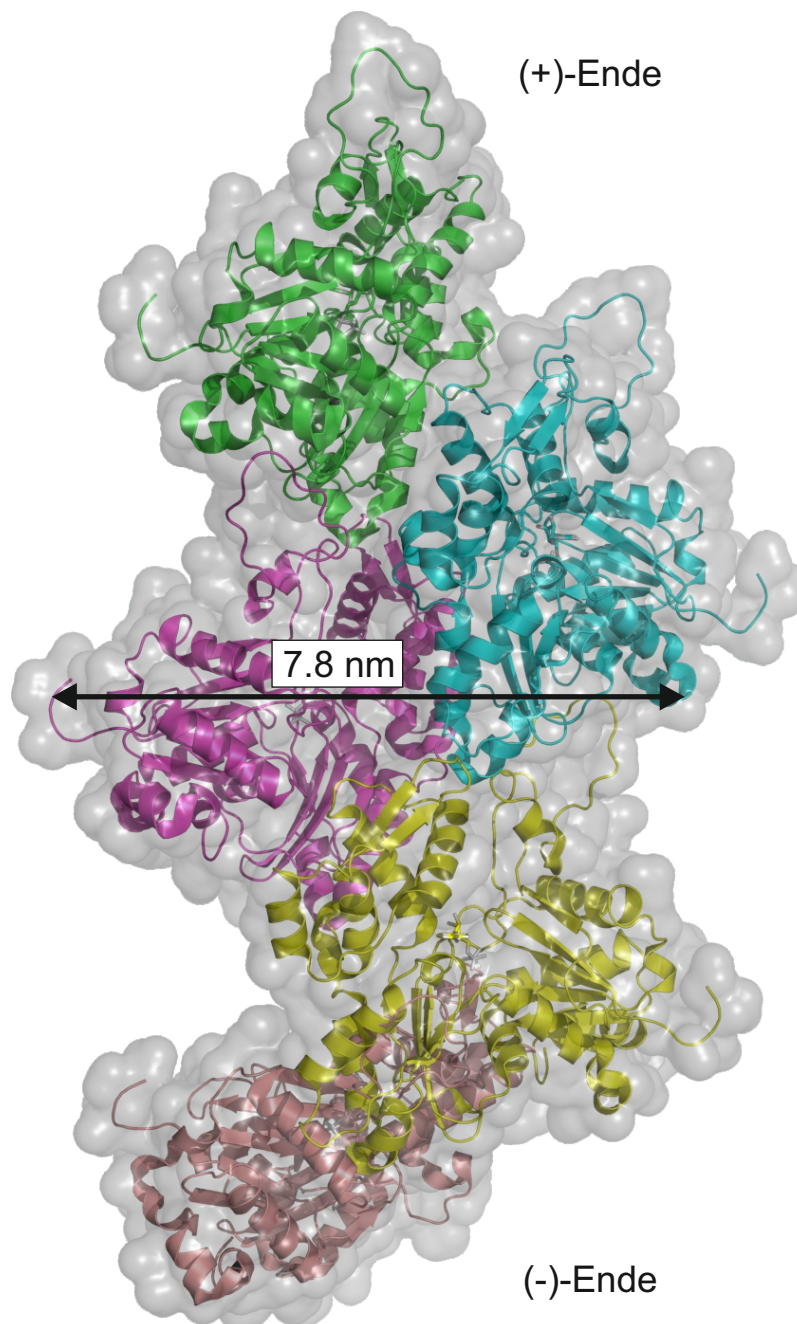
Polymerisationsreaktion ist die langsame Assoziation von Aktinmonomeren zu kleinen energetisch instabilen Nuklei, die aus drei oder vier Aktinmonomeren bestehen.<sup>[60–63]</sup> Diese Nuklei stellen transiente Intermediate dar, die nur wenige Millisekunden und in geringen Konzentrationen existieren, da sie zum einen energetisch instabil sind und zum anderen schnell im folgenden Elongationsprozess konsumiert werden.<sup>[7]</sup> Die formierten Nuklei dienen für die Elongation als Keime, die in beide Richtungen durch die sukzessive Anlagerung von Monomeren verlängert werden. Die Struktur von Aktin weist eine Polarität auf, die zu unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Assoziationsreaktionen der jeweiligen Enden führt. So ist der Prozess der Anlagerung eines Monomers an das (+)-Ende in Abhängigkeit des gebundenen Adenosinphosphates etwa 10–20 mal schneller als am (-)-Ende des Proteins und die Dissoziationskonstante des (+)-Endes ist ebenfalls geringer im Vergleich zum (-)-Ende.<sup>[64]</sup> Die von T. Pollard<sup>[64]</sup> ermittelten Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten) von ATP-G-Aktin an das (+)-Ende und (-)-Ende des Filaments betragen  $11.6 \mu\text{M s}^{-1}$  ( $1.4 \text{ s}^{-1}$ ) und  $1.3 \mu\text{M s}^{-1}$  ( $0.8 \text{ s}^{-1}$ ). Aus diesen Werten ergeben sich die Dissoziationskonstanten der beiden Enden zu  $0.12 \mu\text{M}$  ((+)-Ende) und  $0.6 \mu\text{M}$  ((-)-Ende), die im Kontext der Polymerisationsreaktion auch als kritische Konzentrationen,  $c_c$ , des jeweiligen Filamentendes bezeichnet werden. Sinkt die Konzentration an freien Aktinmonomeren in der Lösung unterhalb der kritischen Konzentration des (-)-Endes des Aktinfilaments, so findet keine Anlagerung mehr statt. An diesem Punkt des Polymerisationsprozesses erfolgt die Dissoziation von Aktinmonomeren vom (-)-Ende. Diese können im Falle eines ATP-Überschusses in der Lösung wieder mit ATP beladen werden und im Anschluss an das (+)-Ende des Filaments assoziieren. Es findet jedoch keine Netto-Elongation des Filamentes mehr statt (Steady-State-Phase), wobei dennoch stetig Aktinmonomere vom (-)-Ende her dissoziieren und am (+)-Ende assoziieren können („*Treadmilling*“): Innerhalb von Aktinfilamenten führt die ATPase-Aktivität von Aktin zu einer schnellen Hydrolysereaktion des in den Protomeren gebundenen ATPs zu ADP und einem Phosphatrest, wobei die anschließende Dissoziation des Phosphatrestes aus dem Filament langsamer abläuft.<sup>[65]</sup> Dies führt während der Steady-State-Phase zu einer Verringerung der Affinität und Dissoziation von ADP-Aktinmonomeren am (-)-Ende, die, wie bereits erwähnt, in Lösung wieder mit ATP beladen werden können und somit am (+)-

Ende reassoziieren.<sup>[23,64,66,67]</sup> In eukaryontischen Zellen wird die Polymerisationsreaktion wiederum durch regulierte und unregulierte Aktin-bindende Proteine modifiziert.<sup>[68]</sup> So existieren beispielsweise Proteine (Capping Protein, Gelsolin), die spezifisch an das (+)-Ende des Filamentes binden und somit die Elongation an diesem Ende blockieren.<sup>[69,70]</sup> Diese Proteine unterliegen wiederum selbst den Regulationsmechanismen der Zelle und können in diesem Fall z.B. durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) inaktiviert werden.<sup>[71,72]</sup> Gelsolin, ein Protein das Aktinfilamente dissoziieren kann, benötigt für diese Funktion Ca<sup>2+</sup>-Ionen.<sup>[73]</sup> Die Proteine, Gelsolin, Capping Protein und der Arp2/3-Komplex, sind in der Lage, die Nukleationsreaktion zu modulieren, wodurch die Anzahl und Länge der Filamente bestimmt werden.<sup>[74]</sup> Wie bereits erwähnt sind bisher etwa 150 Aktin-bindende Proteine identifiziert worden, sodass bereits anhand dieser wenigen Beispiele ersichtlich wird, dass es sich bei der Polymerisationsreaktion von Aktin sowie der Regulierung und Modifizierung dieser um ein hochkomplexes, reguliertes Netzwerk von Interaktionen zwischen Aktin und Aktin-bindenden Proteinen handelt.<sup>[65]</sup> Für detaillierte Informationen bzgl. der zugrundeliegenden Subprozesse der Polymerisationsreaktion und deren Quantifizierung wird an dieser Stelle auf folgende Referenzen verwiesen: Pollard et al. 2007<sup>[75]</sup>, Fujiwara et al. 2007<sup>[23]</sup>, Bindschadler et al. 2004<sup>[68]</sup> und Halavatyi et al.<sup>[76]</sup>

### 1.1.3 Aktinfilamente und Aktinbündel

Bei der Polymerisationsreaktion von G- zu F-Aktin entsteht eine rechtsgängige Helix bestehend aus zwei Aktinsträngen, die umeinander gewunden sind und eine Länge von mehreren  $\mu\text{m}$  erreichen können. Der Durchmesser dieser Filamente beträgt etwa 8 nm.<sup>[77]</sup> Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, weisen Aktinfilamente eine Polarität bzgl. ihrer Enden auf. Das (+)-Ende, bestehend aus Subdomäne I und III, weist wesentlich schnellere Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten für den Anlagerungsprozess von Monomeren auf als das (-)-Ende, bestehend aus Subdomäne II und IV (vgl. Abb. 1.1). Aufgrund der hohen Flexibilität, der damit verbundenen inhärenten Dynamik und der einhergehenden Resistenz gegenüber Kristallisation von Aktinfilamenten, ist die Strukturanalyse auf atomarer Ebene sehr schwierig. Während für G-Aktin bereits mehr als 50 Strukturen mit atomarer Auflösung zur Verfügung stehen, sind Strukturen von Aktin-

filamenten mit einer geringeren Auflösung mittels 3D-Bildrekonstruktionsmethoden von Elektronenmikrographen oder Modellierungen von Röntgen-Faserdiagrammen generiert worden.<sup>[78]</sup>



**Abbildung 1.3:** Quartärstruktur von F-Aktin als Homo-5-mer. Die jeweiligen Protomere sind farblich gekennzeichnet. Zudem wurde die für das Solvens (Wasser) zugängliche Oberfläche (SASA = engl.: *solvent accessible surface area*) dargestellt ( $r_{\text{H}_2\text{O}} = 1.4 \text{ \AA}$ ). Die Kalkulation und Visualisierung erfolgte mittels „The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.“<sup>[44]</sup> basierend auf der Kristallstruktur 3MFP.<sup>[77]</sup>

Im Jahr 2009 gelang es der Arbeitsgruppe um Oda et al. mittels Aufnahme von Röntgenfaserdiagrammen eine radiale Auflösung von 3.3 Å und äquatoriale Auflösung von 5.6 Å zu erzielen.<sup>[25]</sup> Diese Analysen haben gezeigt, dass der wesentliche Unterschied zwischen der Konformation von G- und F-Aktin in der Rotation der Hauptdomänen um 20° liegt. Auch Fuji et al. ermittelten eine Rotation der beiden Hauptdomänen, die allerdings etwas komplexer ist.<sup>[77]</sup> In beiden Fällen ist das Resultat der Rotation der Hauptdomänen, dass die Struktur des Aktinmonomers innerhalb des Filamentes nicht mehr globulär sondern flach wird. In 2014 gelang es auf Basis der Analyse von Cryo-Elektronenmikrographen die dreidimensionale Struktur von F-Aktin im Komplex mit Tropomyosin mit einer Auflösung von 3.7 Å zu bestimmen. Die Arbeiten von Fuji und von der Ecken et al. verdeutlichen u. a. die stabilisierenden Interaktionen innerhalb eines Stranges im Filament und zwischen den beiden Aktinsträngen innerhalb des Filamentes, die im Wesentlichen auf hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen.<sup>[77,79]</sup>

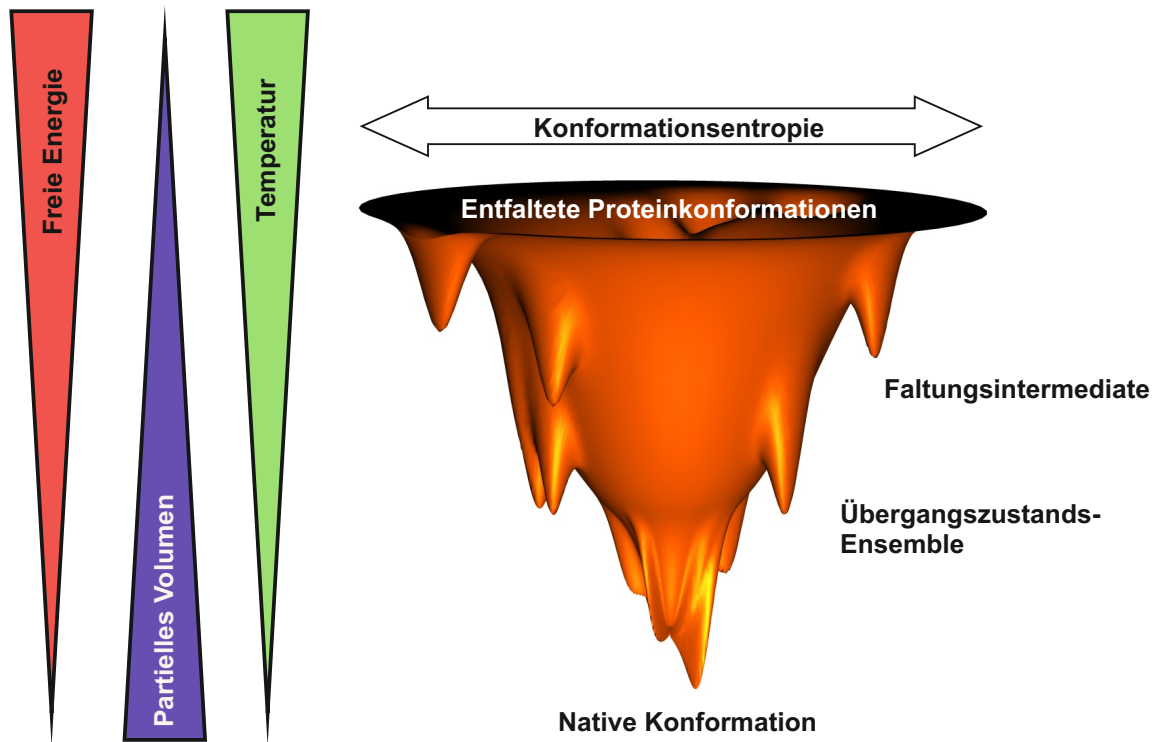
Das Zytoskelett besteht aus verschiedensten netzwerkartigen und gebündelten Aktinstrukturen, die an wichtigen physiologischen Prozessen, wie z.B. Zelladhäsion, Migration, Endozytose oder der Zellteilung beteiligt sind.<sup>[65,80,81]</sup> Aus einem Pool an Aktinmonomeren können, unter Beteiligung einer Vielzahl an Aktin-bindenden Proteinen ( $\alpha$ -Actinin, Filamin, Fascin, Fimbrin, Scruin), als Folge unterschiedlichster Stimuli auf die Zelle, verschiedenste räumlich und zeitlich regulierte Aktinstrukturen gebildet werden, die von feinen Netzwerken bis hin zu dicken Aktinbündeln reichen.<sup>[82]</sup> Hierbei spielen hochorganisierte, axial assemblierte Bündel, die vorwiegend in zellulären Prozessen, wie beispielsweise bei der Erkennung von und dem Widerstand gegen mechanische Einflüsse auf Zellen und der Formgebung der Zelle, eine wichtige Rolle.<sup>[83]</sup> Ein weiteres, sehr interessantes Beispiel für das Vorkommen und die Funktion von axial assemblierten Aktinbündeln stellt das innere Ohr dar: In den Haarspitzen, der im inneren Ohr lokalisierten Haare, sind diese organisierten Aktinstrukturen gefunden worden, die hier an der mechanisch-elektrischen Reizweiterleitung von Geräuschen und Bewegung beteiligt sind.<sup>[84]</sup> Neben der beschriebenen durch Aktin-bindende Proteine regulierten Möglichkeit der Assemblierung von netzwerkartigen und gebündelten Aktinstrukturen, ist es möglich, parallel assemblierte Aktinbündel durch die Zugabe von  $Mg^{2+}$  zu präparieren.

Die Zugabe einer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von 2 mM zu einer Lösung an Aktinmonomeren unter sonst gängigen Pufferbedingungen induziert die Polymerisationsreaktion von G- zu F-Aktin. Wird die  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration im Anschluss auf ca. 50 mM erhöht, assemblieren die vorhandenen Filamente axial zu parakristallinen Aktinbündeln.<sup>[28]</sup> Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass Aktinfilamente eine Art Polyelektrolytsystem darstellen, sodass durch die Zugabe von Ionen die Debye-Länge verringert wird und somit eine Assoziation der Filamente möglich ist.<sup>[85]</sup>

## 1.2 Faltungsstabilität von Proteinkonformationen

*„It is a well-known result of thermodynamics that a substance is only completely characterized when the  $p$ - $V$ - $T$  relation is given.“* Percy Williams Bridgman.<sup>[86]</sup>

Die Stabilität bzw. der Unterschied der freien Energie des nativen funktionellen Zustandes im Vergleich zum entfalteten Zustand eines Proteins ist relativ gering, da die dreidimensionale Konformation von Proteinen im Wesentlichen auf nichtkovalenten Interaktionen, dessen Bindungsenergien im Bereich von 2-25  $\text{kJ mol}^{-1}$  liegen, beruht.<sup>[87]</sup> In einigen Fällen, wie z.B. des Prion-Proteins  $\text{PrP}^{\text{C}}$  (Prion Protein Cellular) kann eine spontane Umfaltung bzw. Missfaltung der Proteinstruktur zur pathogenen Konformation, dem  $\text{PrP}^{\text{C}}$  (Prion Protein Scrapie) führen, die letztendlich der Auslöser der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ist.<sup>[88,89]</sup> Der Faltungsprozess eines Proteins kann durch einen sogenannten Faltungstrichter, wie in Abbildung 1.4 dargestellt, beschrieben werden.<sup>[90]</sup> Hierbei beginnt die Faltung des Proteins, bzw. eines Ensembles an entfalteten Proteinzuständen, dessen Zustände eine hohe freie Energie und Konformationsentropie aufweisen. Während des Faltungsprozesses entstehen Faltungsintermediate, die bereits partiell gefaltete Strukturen aufweisen. Mit fortschreitender Faltung entsteht der Übergangszustand, der im weiteren Verlauf in den nativen Zustand des Proteins, bzw. das Ensemble an nativen funktionellen Zuständen übergeht. Dieses Ensemble an nativen Zuständen besitzt eine minimierte freie Energie.<sup>[91]</sup> Mit steigendem Grad der Faltung sinkt die freie Energie der Proteinkonformation, wobei das partielle Volumen aufgrund von imperfekter Packung und daraus resultierender Kavitäten im Inneren des Proteins ansteigt.<sup>[13]</sup>



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung eines Faltungstrichters. Hierbei beschreibt die Breite des Trichters die Konformationsentropie und die Tiefe die freie Energie eines Ensembles an Faltungszuständen. Der Faltungstrichter soll ausgehend von einem Ensemble ungefalteter Proteinkonformationen die progressive Organisation eines Ensembles an partiell gefalteten Proteinkonformationen, die auf dem Weg zur nativen Konformation eingenommen werden können, skizzieren. Hierbei bezieht sich die freie Energie auf den Faltungsprozess des Proteins.<sup>[90–94]</sup>

In den meisten Fällen genügt zur approximierten Beschreibung des Übergangs der nativen zur entfalteten Proteinstruktur ein Zwei-Zustandsmodell, da dieser Prozess meist hochkooperativ abläuft.<sup>[95–97]</sup> Wird der Entfaltungsprozess somit als Phasenübergang betrachtet, gilt folgende Gleichung:<sup>[98]</sup>

$$\Delta G_u = G_U - G_N = -\Delta S_u dT + \Delta V_u dp \quad (1.1)$$

$\Delta S_u$  und  $\Delta V_u$  sind gegeben als die Änderungen der Entropie und des Volumens während der Entfaltung. Des Weiteren ist die Änderung der freien Energie  $\Delta G_u$  gegeben aus der Differenz der freien Energien des entfalteten ( $G_U$ ) und nativen ( $G_N$ ) Zustands. Der Phasenübergang des nativen zum entfalteten Zustand kann über verschiedene ther-

mododynamische (z.B.  $T$ ,  $p$ ), pH-Wert, Zugabe von Cosolventien, Konzentration an Cosolventien,...) Parameter, die unabhängig voneinander variiert werden können, hervorgerufen werden, sodass sich für die Änderung der freien Energie eine multidimensionale Funktion ergibt:

$$\Delta G_u = \Delta G_{u,0} + f(T, p, \text{pH}, \text{Cosolventien}, c_{\text{Cosolventien}}, \dots) \quad (1.2)$$

Die Funktion  $f$  beinhaltet somit alle Systemparameter, die den N→U-Übergang charakterisieren. Hierzu zählen u. a. Änderungen der Entropie, des Volumens, der Kompressibilität, der spezifischen Wärme sowie der thermischen Expansion des Systems. Unter der Annahme, dass die Kompressibilität, die spezifische Wärme sowie die thermische Expansion des Systems nicht inhärent temperatur- oder druckabhängig sind, kann für den Phasenübergang, bei dem  $\Delta G_u(T, p) = 0$  ist, unter Berücksichtigung, dass alle weiteren Systemparameter außer Temperatur und Druck konstant sind, eine Taylorreihe bis zum Term 2. Ordnung um  $T_0$  und  $p_0$  entwickelt werden, die den Entfaltungsprozess von Proteinen in Abhängigkeit des Drucks und der Temperatur beschreibt:<sup>[11,13]</sup>

$$\begin{aligned} \Delta G_u(T, p) = & \Delta G_{u,0} + \Delta S_u \cdot (T - T_0) + \Delta V_u \cdot (p - p_0) \\ & - \frac{1}{2} \frac{\Delta C_{p,u}}{T} \cdot (T - T_0)^2 + \frac{1}{2} \Delta \kappa'_u \cdot (p - p_0)^2 \\ & + \Delta \alpha'_u \cdot (T - T_0)(p - p_0) \end{aligned} \quad (1.3)$$

Hierbei kennzeichnet  $\Delta$ , in Analogie zu Formel 1.1, die Differenz der jeweiligen Größe des entfalteten gegenüber dem nativen Zustand. Die isotherme Kompressibilität  $\kappa'$  ist definiert als:

$$\kappa' = \left( \frac{\partial V}{\partial p} \right)_T = -V\kappa \quad (1.4)$$

Mit  $\kappa$  dem isothermen Kompressibilitätskoeffizienten. Die isotherme Ausdehnung  $\alpha'$  ist, wie folgt definiert:

$$\alpha' = \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_p = - \left( \frac{\partial S}{\partial p} \right)_T = V\alpha \quad (1.5)$$

Mit  $\alpha$  dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten. Die Wärmekapazität  $C_p$ , ist über die

Enthalpie  $H$  definiert als:

$$C_p = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad (1.6)$$

Somit ist zur Generierung des  $p, T$ -Phasendiagramms die Bestimmung der folgenden sechs thermodynamischen Parameter notwendig:  $\Delta C_{p,u}$ ,  $\Delta V_u$ ,  $\Delta S_u$ ,  $\Delta \kappa'_u$ ,  $\Delta \alpha'_u$  und  $\Delta G_{u,0}$ . Im Falle des Entfaltungsprozesses von Proteinen ergibt sich meist eine elliptische Kurve, die die Phasengrenze beschreibt.

### 1.2.1 Einflüsse von Temperatur, Druck, Cosolventien und Crowding

Während des temperatur-induzierten Entfaltungsprozesses verändert sich die native Konformation eines Proteins aufgrund der Zufuhr thermischer Energie in eine ungeordnete Struktur, wodurch die Konformationsentropie ansteigt. Zudem gelangen hydrophobe, innere Bereiche des Proteins nach außen und werden durch umgebende Wassermoleküle hydratisiert.<sup>[99]</sup> Durch die Hydratisierung hydrophober Bereiche entstehen im Vergleich zur Struktur der umgebenden Wassermoleküle lokal geordnetere Wasserstrukturen.<sup>[100]</sup> Des Weiteren kann eine Zusammenlagerung intermolekularer hydrophober Bereiche zur Proteinaggregation führen.<sup>[101]</sup> Hydrostatischer Druck stellt neben der Temperatur und den Solvensbedingungen einen wichtigen physikalischen Parameter dar, der das thermodynamische Gleichgewicht und die Geschwindigkeit von Reaktionen modifizieren kann. Die Denaturierung von Proteinen wird meist mittels hoher Temperaturen bei Atmosphärendruck oder durch Zugabe von chemischen Denaturierungsmitteln, wie z.B. Guanidinhydrochlorid (GdmCl) oder Harnstoff studiert. Die Interpretation der Ergebnisse ist teils komplex, da eine Temperaturveränderung immer mit einer gleichzeitigen Änderung des Volumens und der thermischen Energie des Systems einhergeht. Werden chemische Denaturierungsmittel eingesetzt, können thermodynamische Parameter durch die Bindung dieser Substanzen an das Protein beeinflusst werden.<sup>[11]</sup> Der Einsatz von Druck als physikalischer Parameter zur Proteindenaturierung bietet den Vorteil, dass eine Druckänderung ausschließlich zu Änderungen des mit dem Entfaltungsprozesses verbundenen Volumens  $\Delta V_u$  führt.<sup>[102]</sup> Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der schnellen Wiederherstellung der Ausgangsbedingungen,



indem die Probe dekomprimiert wird, was in den meisten Fällen zur Renaturierung der Proteine führt, da der druck-induzierte Entfaltungsprozess häufig reversibel ist.<sup>[103]</sup> Unter der Annahme eines Zwei-Zustandsprozesses der druck-induzierten Proteindenaturierung, ist die Gleichgewichtskonstante  $K$ , wie folgt vom Druck abhängig:<sup>[13]</sup>

$$\left( \frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V_u}{RT} \quad (1.7)$$

Das partielle Volumen eines Solvats bzw. Proteins  $V_i$  in einem Solvens ist definiert als das Verhältnis der Volumenänderung, die auftritt, wenn das Protein  $i$  in diesem Solvens gelöst wird und der Stoffmenge des Proteins, die im Solvens gelöst wurde, während die Stoffmengen weiterer Komponenten konstant bleiben. Für eine ideale Mischung ergibt sich  $V_i$  aus der Differenz des Volumens vor und nach dem Lösen des Proteins. Jedoch wird aufgrund von Hydratationseffekten durch die Lösung des Proteins ebenfalls das Volumen des Solvens selbst beeinflusst werden. Aus diesem Grund kann das partielle Volumen  $V_i$  als Summe von intrinsischen Termen und eines Hydratationsterms definiert werden:<sup>[103]</sup>

$$V_i = V_{\text{Atom}} + V_{\text{Hohlräume}} + \Delta V_{\text{Hydratation}} \quad (1.8)$$

$V_{\text{Atom}}$  stellt das Van-der-Waals-Volumen der Atome des Proteins dar,  $V_{\text{Hohlräume}}$  beschreibt das Volumen an Hohlräumen eines Protein, die aufgrund einer imperfekten Packung der nativen Proteinkonformation entstehen und  $\Delta V_{\text{Hydratation}}$  stellt die Volumenänderung basierend auf Interaktionen zwischen Solvat und Solvens dar. Da sich während der Faltung von Proteinen das Van-der-Waals-Volumen der Atome nicht ändert, kann die Volumenänderung des Entfaltungsprozesses wie folgt definiert werden:<sup>[103–105]</sup>

$$\Delta V_i = \Delta V_{\text{Hohlräume}} + \Delta \Delta V_{\text{Hydratation}} \quad (1.9)$$

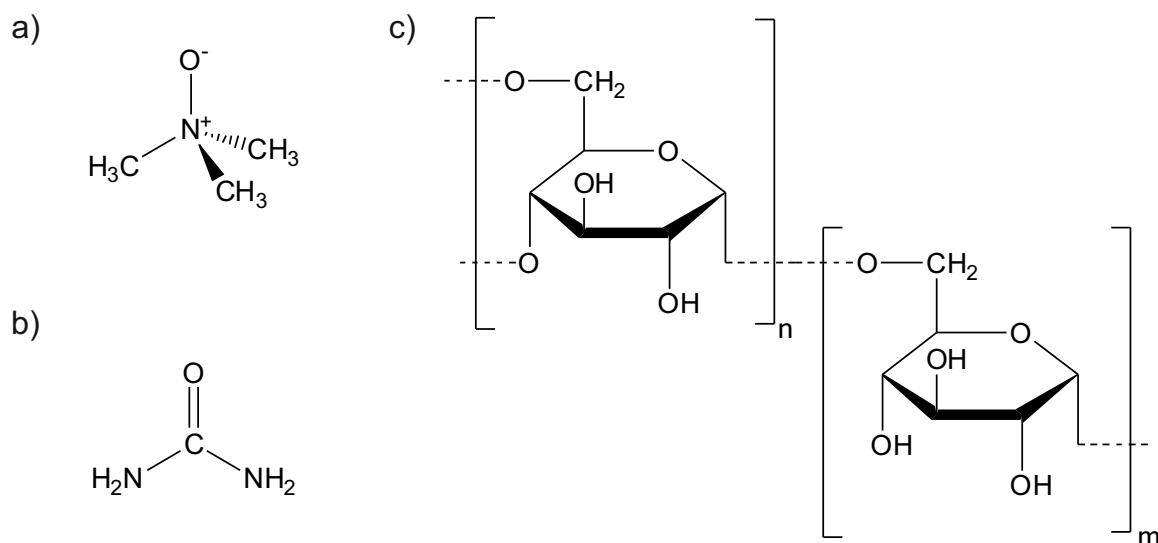
Genannte Hydratationsbeiträge resultieren maßgeblich aus der Hydratation hydrophober und hydrophiler Gruppen des Proteins sowie der Hydratation von Proteinhohlräumen.<sup>[106]</sup> Hierbei ist der Effekt der Hydratation geladener Gruppen im Verhältnis zur Hydratation hydrophober Bereiche größer, da Ionen in Kontakt mit Wassermolekülen, basierend auf Coulomb-Kräften, attraktive Wechselwirkungen mit den Dipolen

dieser eingehen.<sup>[107,108]</sup> Allerdings wurde experimentell gezeigt, dass der Hauptbeitrag der Volumenänderungen des Entfaltungsprozesses durch die Freisetzung proteininterner Hohlräume entsteht und zudem meist negativ ist.<sup>[13,106,109,110]</sup> In Analogie zu Gleichung 1.7 kann die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  wie folgt formuliert werden:<sup>[111]</sup>

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (1.10)$$

Hier stellt  $\Delta V^\ddagger$  das Aktivierungsvolumen dar. Bei der Applikation von Druck wird jede Reaktion, die mit einer Volumenänderung ungleich null verbunden ist seitens des kompakteren Zustands verschoben (in Übereinstimmung mit dem Prinzip von LE CHÂTELIER). Weiterhin wird jede Reaktion, die mit einer negativen Änderung des Aktivierungsvolumens  $\Delta V^\ddagger < 0$  verbunden ist, beschleunigt und ist  $\Delta V^\ddagger > 0$ , wird die Reaktion verlangsamt.

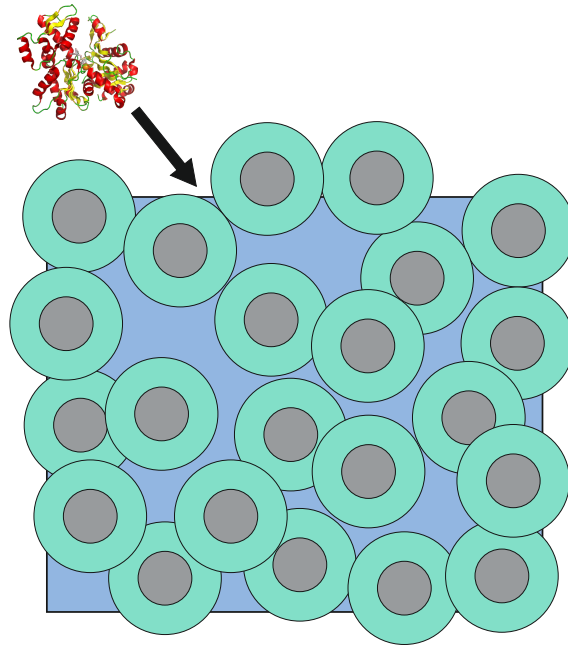
Neben Temperatur und Druck ist ein weiterer wichtiger Parameter, der zur Stabilisierung / Destabilisierung von Proteinen in Lösung beiträgt, die Gegenwart von Co-solventien, die somit ebenfalls auf Proteininteraktionen und -wechselwirkungen Einfluss nehmen. Derartige chemische Verbindungen sind *in vivo* sehr häufig anzutreffen und daher von essentieller Bedeutung für das Verständnis von Proteinstabilitäten und -wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen. Natürliche Osmolyte, wie Zucker, Polyole, Aminosäuren oder Methylamine, werden u.a. von Meeresorganismen akkumuliert, um dem osmotischen Druck entgegenzuwirken und somit das Zellvolumen aufrecht zu erhalten. Außerdem tragen sie zur Stabilisierung des nativen Zustands von Proteinen bei und werden daher häufig auch als chemische Chaperone bezeichnet.<sup>[5,6]</sup> Im Falle des natürlichen Osmolyts TMAO (Trimethylamin-*N*-Oxid) konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass in Gegenwart dieser Verbindung Proteinstrukturen gegenüber Temperatur und Druck stabilisiert werden können.<sup>[112–115]</sup> Es wurde ebenfalls beobachtet, dass das chemische Gleichgewicht von Proteinassemblierungsreaktion in Gegenwart von TMAO in Richtung der oligomeren Spezies verschoben wird.<sup>[116,117]</sup> Die molekularen Mechanismen, die zu diesen Effekten führen, sind Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. TMAO weist in wässrigen Lösungen starke Wechselwirkungen mit Wassermolekülen auf und ist somit in der Lage, die Wasserstruktur zu verändern.



**Abbildung 1.5:** Strukturformeln von TMAO (a), Harnstoff (b) und dem Biopolysaccharid Dextran (c).

So wurde eine Erhöhung der Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen pro Wassermolekül und eine Stärkung dieser in Gegenwart von TMAO nachgewiesen.<sup>[118]</sup> Des Weiteren ist die Affinität von TMAO zu Proteinseitenketten als auch zum Proteinrückgrat gering, sodass der Osmolyt von der Proteinoberfläche preferentiell ausgegrenzt wird und hierdurch eine stabilisierende Wirkung auf die Proteinstruktur resultiert, da intramolekulare Wechselwirkungen des Proteins gegenüber TMAO-Protein-Wechselwirkungen favorisiert werden.<sup>[6]</sup> Neueste Studien zeigen ebenfalls, dass TMAO in erhöhten Konzentrationen als molekularer Crowder fungieren kann.<sup>[114]</sup>

Im Vergleich zu TMAO weist der ebenfalls natürliche Osmolyt Harnstoff, der in vielen Lebewesen als ein Endprodukt des Harnstoffzyklus entsteht, eine gegensätzliche Wirkung auf. Diese chaotrope Verbindung ist chemisch gesehen sehr ähnlich der des Proteinrückgrats. Eine verbreitete Hypothese des zugrundeliegenden Mechanismus der Proteinentfaltung durch Harnstoff basiert daher auf den Interaktionen zwischen Harnstoff und dem Proteinrückgrat. Aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften wird postuliert, dass Harnstoff um intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen des Proteinrückgrats, die Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter stabilisieren, konkurriert.<sup>[119–121]</sup> Weiterhin konnten Wechselwirkungen zwischen Harnstoff und Proteinseitenketten nachgewiesen werden.<sup>[122–124]</sup> Da die entfaltete Konformation von Proteinen eine höhere Anzahl an derartigen Wechselwirkungsmöglichkeiten auf-



**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung einer hochkonzentrierten Lösung an Makromolekülen und dem verfügbaren Volumen (hellblau) für ein weiteres Protein ähnlicher Größe. Modifizierte Darstellung nach A.P. Minton.<sup>[125]</sup>

weist als die native Konformation, wird das chemische Gleichgewicht zwischen nativer und entfalteter Proteinstruktur,  $N \rightleftharpoons U$ , durch Harnstoff seitens der entfalteten Struktur verschoben, da dieser Zustand des Systems enthalpisch begünstigt ist.<sup>[6,121]</sup>

Eine charakteristische Eigenschaft biologischer Zellen ist die hohe Konzentration an Makromolekülen, die etwa 30 % des Gesamtvolumens der Zelle einnehmen.<sup>[8]</sup> In dieser Umgebung laufen alle physiologischen Prozess ab und es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass sowohl die Stabilität von Proteinen, als auch die Reaktionskinetik, wie z.B. Oligomerisierungsreaktionen, in hochkonzentrierten Lösungen signifikant beeinflusst werden.<sup>[125,126]</sup> Um diesen Effekt *ex vivo* simulieren zu können, werden Substanzen, wie beispielsweise langkettige hochverzweigte Polysaccharide (z.B. Dextran, Ficoll) oder ebenfalls wasserlösliche Polymere, wie Polyethylenglycol, eingesetzt.<sup>[126]</sup> So wurde unter Einsatz dieser makromolekularen Crowder (engl.: *crowded*: überfüllt) z.B. eine Beschleunigung der Fibrillierungsreaktion von Amyloid-Fibrillen aus  $\alpha$ -Synuclein und der Selbstassemblierungsreaktion des HIV Kapsid-Proteins nachgewiesen.<sup>[127,128]</sup> Weiterhin zeigten Studien bzgl. der Druckstabilität von RNase A, dass die Druckresistenz des Proteins in Gegenwart hoher Konzentrationen an Dextran signifikant erhöht

werden kann und die thermische Stabilität von SNase in Gegenwart von Ficoll drastisch erhöht wird.<sup>[129,130]</sup> Theoretisch werden diese Beobachtungen auf Basis des „*excluded volume*“-Effekts erklärt (Abb. 1.6). So wird von einem Makromolekül, das sich in einem definierten Volumen befindet, zum einen das Volumen des Moleküls selbst eingenommen und zum anderen, bei hoher Konzentration, ein signifikantes Volumen des zur Verfügung stehenden Volumens ausgeschlossen, sodass für ein weiteres Makromolekül (z.B. ein Protein) ein wesentlich geringeres Volumen zur Verfügung steht.<sup>[125]</sup> Aus diesem Grund erhöht sich die effektive Konzentration des Proteins (bezogen auf das noch zur Verfügung stehende Volumen).<sup>[131]</sup> Resultierende Effekte sind die Erhöhung von Aktivitätskoeffizienten und Geschwindigkeitskonstanten von z.B. Assemblierungsprozessen oder die Stabilisierung von nativen Proteinstrukturen.<sup>[8,129,130]</sup>

## 2 Etablierung eines Hochdruckmesssystems

### 2.1 Einleitung und Zielsetzung

Der Druckeffekt auf biologische Systeme ist neben dem Effekt von Temperatur und Cosolventien oder Crowdern eine sehr interessante thermodynamische Größe, die detaillierte Informationen über thermodynamische und kinetische Eigenschaften biologischer Prozesse liefern kann.<sup>[132]</sup> Auch wenn druckabhängige Analysen biologischer Systeme im Vergleich zu temperaturabhängigen Studien noch nicht so weit verbreitet sind, existieren bereits eine Vielzahl an Analysemethoden, wie z.B. Messsysteme für druckabhängige NMR-, UV/Vis-, Fluoreszenz- oder IR-Spektroskopie. Des Weiteren konnten bereits Blitzlichtphotolyse-, Affinitätschromatographie-, Röntgenkleinwinkelstreuungs- und Stopped-Flow-Experimente unter Druck realisiert werden, dessen Apparaturen bereits teilweise kommerziell verfügbar sind.<sup>[109,111,132–142]</sup> Diese Messsysteme bieten allerdings keine oder nur eingeschränkte Informationen bzgl. räumlich-zeitlicher Veränderungen biologischer Systeme und sind ebenfalls nicht zur *in situ*-Visualisierung der Probe geeignet. Diesbezüglich existieren zur Zeit nur sehr wenige Messaufbauten, die jedoch im Wesentlichen nicht kommerziell verfügbar sind oder zu geringe Maximaldrücke aufweisen.<sup>[143,144]</sup> Zur Analyse der räumlich-zeitlichen Veränderungen und Visualisierung des Druckeffekts auf z.B. Biomembranen, Aktinfilamente, -netzwerke, -bündel oder Zellen, wird in diesem Kapitel ein neu etabliertes Hochdruck-Messsystem, basierend auf der Diamantstempeltechnik, die Drücke bis etwa 16 kbar zulässt, in Kombination mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie, Phasenkontrastmikroskopie und Fluoreszenzspektroskopie, beschrieben. Dieser Messaufbau ermöglicht

die Charakterisierung der Probe mittels der genannten Techniken, ohne dass die Hochdruckzelle bewegt werden muss, was einen wesentlichen Vorteil bei der praktischen Durchführung der Experimente bietet. Des Weiteren wurde im Rahmen dieses Projektes, zum Zwecke der Hochdruck-Mikroskopie, ein interner Druckindikator kalibriert und ein Hochdruck-FTIR-Messsystem automatisiert. Die Automatisierung dieses Messsystems kann prinzipiell auf weitere Messmethoden übertragen werden und bietet eine enorme Zeitersparnis im Vergleich zur manuellen Steuerung derartiger Hochdrucksysteme.

## **2.2 Etablierung eines Hochdruckmikroskopie- und Spektroskopiesystems basierend auf der Diamantstempeltechnik**

### **2.2.1 Material und Methoden**

#### **Chemikalien**

BaSO<sub>4</sub> (Bariumsulfat) wurde dargestellt, indem äquimolare Mengen an Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Natriumsulfat) und BaCl<sub>2</sub> (Bariumchlorid) (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland), gemischt wurden. Als Lösungsmittel diente D<sub>2</sub>O. Nach Durchmischung der Probe kommt es zur Bildung von NaCl und BaSO<sub>4</sub>. Das unlösliche BaSO<sub>4</sub> wurde durch mehrmalige Zentrifugations- und Waschschrte vom löslichen NaCl abgetrennt, wobei als Lösungsmittel weiterhin D<sub>2</sub>O diente, da das Salz in späteren IR-Experimenten Anwendung finden sollte. FluoSpheres<sup>®</sup> mit einem Fluoreszenzanregungsmaximum von 580 nm, einem Emissionsmaximum von 605 nm und einem Partikeldurchmesser von 2 µm wurden von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen (Katalognr.: F-8826). Vor der Verwendung wurde ein Aliquot an FluoSpheres<sup>®</sup> 1 : 100 in Wasser oder entsprechendem Puffer verdünnt. Anschließend wurde die Lösung bei 1200 g für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut in Wasser oder entsprechendem Puffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. BisTris (Bis-(2-hydroxyethyl)-amino-tris-(hydroxymethyl)-methan) wurde von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) bezogen.

## Druckabhängige FTIR-Spektroskopie

Druckabhängige FTIR-spektroskopische Studien wurden an einem MAGNA 550 FTIR-Spektrometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), ausgestattet mit einem Stickstoff-gekühlten MCT-Detektor (HgCdTe, Quecksilber-Cadmium-Tellur), im Wellenzahlenbereich von 4000 - 650  $\text{cm}^{-1}$  mit einer Auflösung von 1  $\text{cm}^{-1}$ , durchgeführt. Um Proben mit Drücken bis zu ~16 kbar auszusetzen, wurde eine membrangetriebene Diamantstempelzelle (Diacell<sup>®</sup> VivoDAC) der Firma Almax easyLab (Diskmuide, Belgien) verwendet. Zum kontrollierten Druckaufbau wurde ein automatisierter, pneumatischer Druckregler der Firma GE verwendet (PACE 5000; vertrieben durch Almax easyLab: iGM Controller). Als Abstandshalter und Probenraum diente ein Dichtungsring aus Messing ( $\varnothing = 4 \text{ mm}$ ,  $d = 50 \mu\text{m}$ ) mit einer zentrierten Bohrung ( $d = 0.5 \text{ mm}$ ), wodurch sich ein Probenvolumen von ~10 nL ergibt. Dieser Dichtungsring wurde auf einem 730  $\mu\text{m}$  starken Diamantfenster (Diamant-Typ IIa, Almax easyLab) platziert und 3  $\mu\text{L}$  Probe auf die Bohrung aufgebracht. Als interner Druckindikator wurde die druckabhängige Bandenverschiebung der  $\text{SO}_4^{2-}$ -Streckschwingung von Bariumsulfat ( $\text{BaSO}_4$ ) mit einer Absorptionsbande bei ~983.4  $\text{cm}^{-1}$  (bei Atmosphärendruck) verwendet.<sup>[145]</sup>

## Phasenkontrastmikroskopie

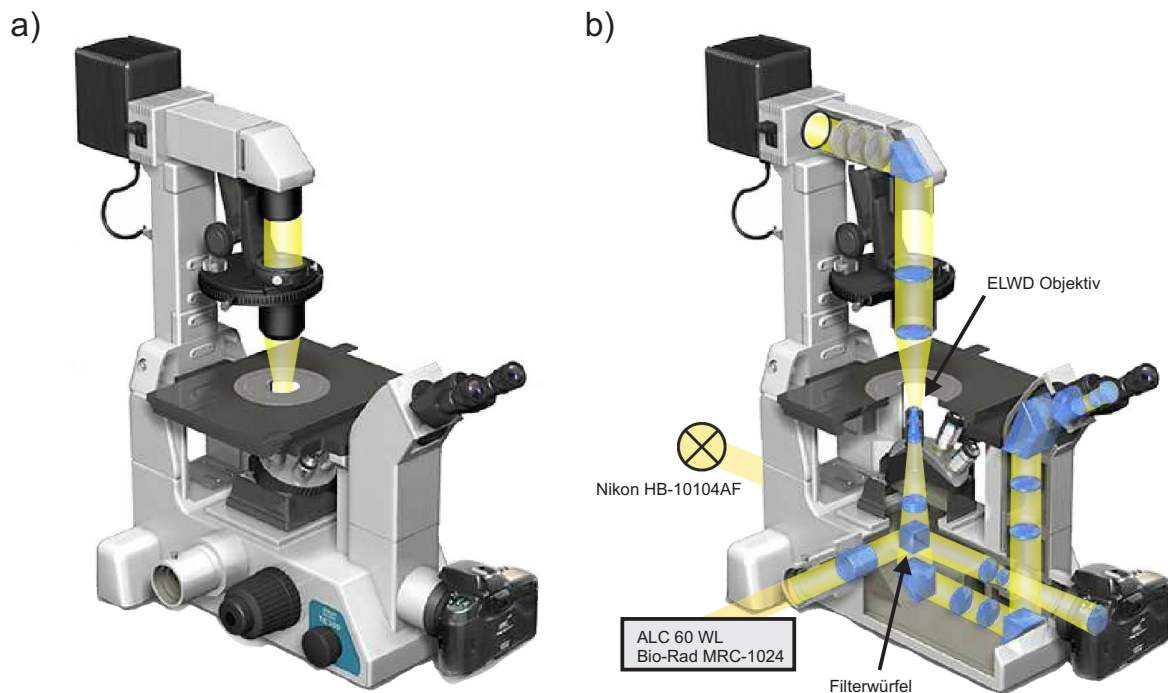
Zur Phasenkontrastmikroskopie wurde ein inverses Mikroskop des Modells Eclipse TE2000-U (Nikon, Melville, NY, USA) verwendet. Als Phasenkontrastobjektive dienten ein Nikon CFI Plan Fluor ELWD 20 $\times$  (NA 0.45, Phasenblende Ph1, Phasenring DM (Dark Medium), WD (Working Distance) 7.4 mm) und ein Nikon CFI 10 $\times$  (NA 0.25, Phasenblende Ph1, Phasenring ADL (Apodized Dark Low), WD 6,2 mm, Nikon Inc.). Die Aufnahmen wurden mittels einer integrierten Kamera Digital Sight DS-5Mc (Nikon) durchgeführt, die über einen Kameracontroller Digital Sight DS-U1 (Nikon) und der zugehörigen Software ACT-2U (Nikon) gesteuert wird.

## Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Zur konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (engl.: *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) wurde ein invertiertes Nikon Eclipse TE300 Mikroskop (Melville, NY, USA)



verwendet. Als Detektor diente ein Bio-Rad MRC-1024 (Hercules, CA, USA). Die Proben wurden mittels eines Krypton-Argon-Lasers (Laserlinien: 488 nm, 568 nm und 647 nm, ALC 60WL, 15 mW, Dynamic Laser, Utah, USA) angeregt und das Laserlicht mittels eines Nikon LU Plan ELWD 50 $\times$ /0.55 B in die Probe fokussiert. Hierbei handelt es sich um ein Trockenobjektiv, das einen Arbeitsabstand von 10.1 mm zur Probenebene ermöglicht. Zur Steuerung des Messsystems diente die Software LaserSharp2000 (BioRad, Hercules, CA, USA). Zur nachträglichen Bildbearbeitung (*Histogrammstretch* und *Nicht-lineare Histogrammanpassung*) wurde die Software ImageJ<sup>[146]</sup> verwendet.



**Abbildung 2.1:** Nikon Eclipse TE300 Mikroskop (a). Das Mikroskop verfügt, neben der Lampe oberhalb des Mikroskopietischs zur Anregung von Fluoreszenz, über eine 100 W Quecksilberdampfampe (Nikon HB-10104AF) und einen Krypton-Argon-Laser (ALC 60WL) (b). Über die entsprechenden Filter im Filterwürfel werden die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Quecksilberdampfampe selektiert (modifizierte Darstellung nach<sup>[147]</sup>).

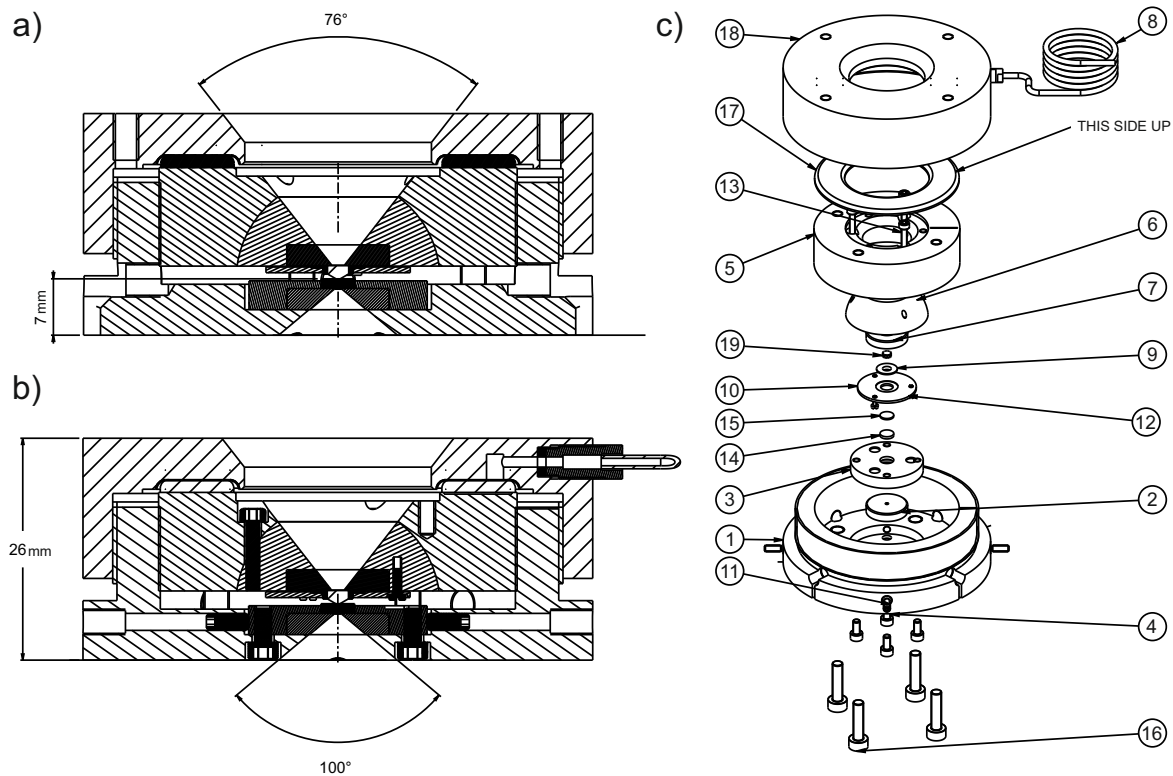
## **Temperatur- und druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie mittels K2 Fluoreszenzspektrometer**

Temperatur- und druckabhängige fluoreszenzspektroskopische Messungen wurden an einem K2 Fluoreszenzspektrometer der Firma ISS (Champaign, Illinois, USA) durchgeführt. Als Hochdruckzelle wurde die HPCell der Firma ISS in Kombination mit Quarzglasfenstern verwendet, wodurch ein Maximaldruck von 3 kbar ermöglicht wird. Temperaturabhängige Messungen wurden in Fluoreszenzküvetten des Typs 101-QS der Firma Hellma (Mühlheim, Deutschland) durchgeführt. Die Temperierung erfolgte mit einem Thermostaten (F25-MV) der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland).

### **2.2.2 Diacell<sup>®</sup> VivoDAC - Eine membrangetriebene Diamantstempelzelle**

#### **Technische Details der Diacell<sup>®</sup> VivoDAC**

Die Diamantstempelzelle (engl.: *diamond anvil cell*, DAC) Diacell<sup>®</sup> VivoDAC wird von der Firma Almax easyLab (Diksmuide, Belgien) kommerziell vertrieben (Abb. 2.2). Die Druckerzeugung beruht auf der Weiterentwicklung der Diamantstempeltechnik, wie sie bereits 1959 von Weir et al. beschrieben wurde.<sup>[148]</sup> Anstatt von üblicherweise zwei sich gegenüberliegenden Diamantstempeln, wird in dieser Zelle eine Diamantstempel / Diamantfenster-Kombination verwendet (Abb. 2.2). Diese Bauweise ermöglicht die Observierung der Probe durch das, in Relation zu Diamantstempeln wesentlich dünnere, Diamantfenster, wodurch die Anwendung von verschiedenen Mikroskopie-Techniken ermöglicht wird. Ein weiterer Unterschied zur bisherigen Diamantstempeltechnik liegt in der Methode des Druckaufbaus. Im Vergleich zu älteren DAC-Modellen wird bei diesem Modell der Druck über eine dünne Gasmembran erzeugt, die vergrößert wird und letztendlich dazu führt, dass der Diamantstempel auf die Probe drückt. Der Einsatz eines pneumatischen Systems zur Druckerzeugung ermöglicht eine präzise Steuerung des Drucks und ermöglicht zudem die Automatisierung von Druckrampen.



**Abbildung 2.2:** Seitenansicht der Diamantstempelzelle Diacell<sup>®</sup> VivoDAC der Firma Almax easyLab (a,b) sowie oberer und unterer Öffnungswinkel des Zellgehäuses. In b sind ebenfalls Justageschrauben des Sitzes für das Diamantfenster und den Diamantstempel eingezeichnet. Bauteile zur kompletten Assemblierung der Zelle (c). In Tabelle 2.1 finden sich die jeweiligen Bezeichnungen der einzelnen Bauteile. Die technischen Zeichnungen wurden freundlicherweise von der Firma Almax easyLab zur Verfügung gestellt und modifiziert dargestellt.

**Tabelle 2.1:** Bezeichnungen der Einzelteile der Diacell<sup>®</sup> VivoDAC dargestellt in Abbildung 2.2 c). Die Bezeichnungen wurden von der Herstellerfirma übernommen und sind daher in englischer Sprache verfasst.

Nr.	Bezeichnung
1	VivoDAC cylinder
2	seat, low hole
3	VivoDAC, lower retainer
4	screw, M2 $\times$ 4
5	VivoDAC, piston
6	VivoDAC, hemisphere
7	upper seat
8	gas capillary
9	VivoDAC, anvil ring
10	VivoDAC, upper retainer
11	screw, M2 $\times$ 5
12	screw, M1 $\times$ 3
13	screw, M1.6 $\times$ 8
14	single crystal window, diamond type IIa
15	gasket <sup>i</sup> , diameter = 3.95 mm
16	screw, M3 $\times$ 12
17	VivoDAC, pressure ring
18	gas membrane
19	diamond anvil, type Ia, x = 2.5 mm, h = 1.55 mm

<sup>i</sup> Als Dichtungsmaterial wurde entweder Messing (Dicke: 50  $\mu$ m, halbhart, Cu: 63 %, Zn: 37 %) oder eine Kupfer-Berylliumlegierung (Dicke: 500  $\mu$ m, halbhart, Cu: 98 %, Be: 2 %) mit einem Bohrungsdurchmesser von 500  $\mu$ m verwendet. Die Anfertigung der Dichtungen erfolgte in der hauseigenen Werkstatt. Die Materialien wurden als Folie von der Firma GoodFellow (Bad Nauheim, Deutschland) bezogen.

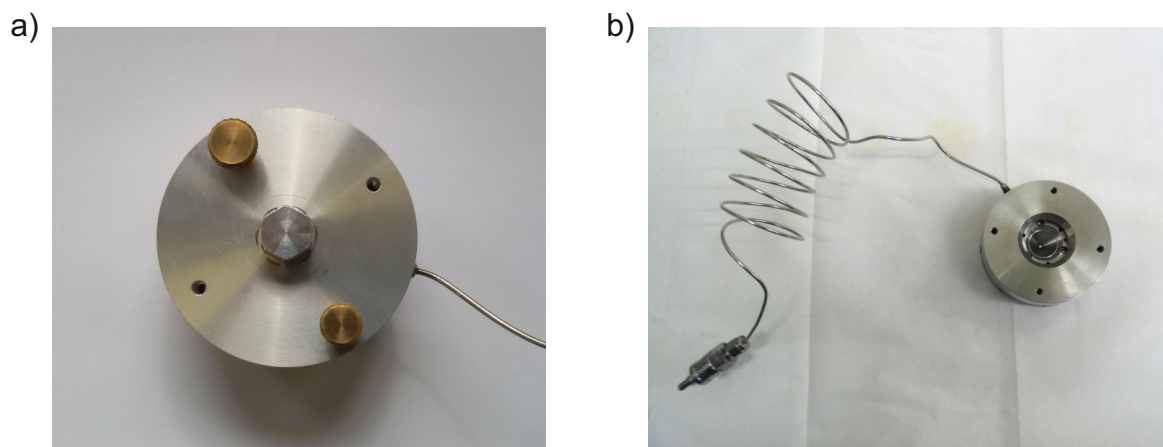
### Assemblierung der Diacell<sup>®</sup> VivoDAC

Vor der Assemblierung der Diamantstempelzelle, wurde vor allem das Diamantfenster (14), der Diamantstempel (19) und die Auflagefläche (2) des Diamantfensters zunächst gründlich mit bidestilliertem Wasser und im Anschluss mit Ethanol gereinigt. Nach erfolgter Reinigung wurde zunächst das Diamantfenster in die vorgesehene Haltevorrichtung (3) eingelegt. Anschließend kann die zuvor gereinigte Dichtung (15) auf das Diamantfenster aufgelegt werden. Bevor die Probe aufgebracht werden kann, wurde die Dichtung mit handelsüblicher Knete fixiert. Anschließend wird auf die Bohrung der Dichtung, die einen Durchmesser von 500  $\mu\text{m}$  und eine Höhe von 50  $\mu\text{m}$  (Messingdichtungen) oder 500  $\mu\text{m}$  (Kupfer-Beryllium-Dichtungen) aufweisen, ein Probenvolumen von 3-5  $\mu\text{L}$  aufgetragen. Nun kann der Kolben (5) vorsichtig in den Zylinder (1) eingesetzt werden, ohne ihn jedoch zunächst komplett hinunterzudrücken. Bevor der Kolben komplett in den Zylinder hinuntergedrückt wurde, wird die Zelle auf ein Durch- und Auflichtmikroskop (Researcher ICD LED) der Firma Bresser (Rhede, Deutschland) aufgebracht. Unter dem Mikroskop, kann der Kolben hinuntergedrückt werden, bis der Diamantstempel in Kontakt mit der Dichtung kommt. Nun wird die Gasmembran (18) aufgeschraubt bis der Kontakt zum Kolben spürbar wird. Da die Membran eine Schichtdicke von nur wenigen Mikrometern aufweist, wird hier, um eine Beschädigung zu vermeiden, eine eigens für die Kontrolle des Anzugsdrehmoments der Verschraubung angefertigte Vorrichtung auf die Membran geschraubt (Abb. 2.4 a).

**Abbildung 2.3:** Zylinder der Diacell<sup>®</sup> VivoDAC (links). Das Diamantfenster ist bereits in die Haltevorrichtung eingelegt worden. Rückansicht des Kolbens der Zelle (rechts). Im Zentrum des Kolbens ist der Diamantstempel zu erkennen.



Über diese Aufnahme kann mittels eines Drehmomentschlüssels die Gasmembran mit einem Drehmoment von 500 cNm angezogen werden. Dieses Anzugsdrehmoment stellt sicher, dass die Zelle dicht verschlossen ist. Nun kann das Ende der Kapillare (8) mit dem Anschluss des pneumatischen Drucksteuerungssystems (GE PACE5000) verbunden werden (Kapitel 2.2.5).



**Abbildung 2.4:** Vorrichtung zur kontrollierten Verschraubung der Membran mit dem Zellzylinder. Zunächst wird die Vorrichtung mittels zweier Rändelschrauben auf die Membran geschraubt. Diese kann nun handfest auf den Zellzylinder geschraubt werden. Die Sechskantaufnahme dient zum Ansetzen eines Drehmomentschlüssels, um die Membran mit einem Drehmoment von 500 cNm zu verschrauben (a). Diacell<sup>®</sup> VivoDAC assembliert (b).

### 2.2.3 Implementierung eines modularen Fluoreszenzspektrometers in ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop

Da die fluoreszenzspektroskopischen Messungen in erster Linie zur Druckbestimmung innerhalb der Diamantstempelzelle während Laser-Raster-Mikroskopie-Analysen dienen, ist es von Vorteil, diese direkt an Ort und Stelle der Mikroskopiemessungen durchführen zu können. Somit wird ein Wiederfinden von speziellen Stellen in der Probe stark vereinfacht. Des Weiteren muss die Zelle nicht für jede Druckbestimmung vom Mikroskopietisch entnommen werden bzw. nach der Druckbestimmung neu eingekoppelt werden. Die Diamantstempelzelle Diacell<sup>®</sup> VivoDAC kann somit während der kompletten druckabhängigen Messungen auf dem Mikroskopietisch verbleiben. Prinzipiell basiert das in dieser Arbeit aufgebaute Fluoreszenzspektrometer auf einer modularen

**Tabelle 2.2:** Lichtleiter

Bezeichnung	Anschluss	$\phi^i / \mu\text{m}$	$\lambda$ -Bereich <sup>ii</sup> / nm	$L^{\text{iii}}$ / m	LTBR <sup>iv</sup> (STBR) <sup>v</sup> / cm
QP600-025-SR-BX	SMA905	600	200 - 1100	0.25	24(12)
QBIF600-040-SR-BX	SMA905	600	200 - 1100	0.4	24(12)
UM22-600	SMA905 <sup>vi</sup>	600	180 - 1150	1.5	16.7(6.6)

<sup>i</sup> Durchmesser des Lichtleiters    <sup>ii</sup> Arbeitsbereich    <sup>iii</sup> Länge des Lichtleiters    <sup>iv</sup> Langzeitbiegeradius  
<sup>v</sup> Kurzzeitbiegeradius    <sup>vi</sup> An einem Ende dieses Lichtleiters wurde der SMA905-Anschluss und der komplette Schutzmantel (41.5 mm) entfernt. Das Ende der Glasfaser wurde poliert.

Bauweise. Für eine größtmögliche Flexibilität wurde zur Weiterleitung von elektromagnetischer Strahlung auf den Einsatz einer optischen Bank und fester optischer Bauteile verzichtet. In dem hier vorgestellten Aufbau werden ausschließlich, die in Tabelle 2.2 dargestellten Lichtleiter zur Weiterleitung von Strahlung verwendet.

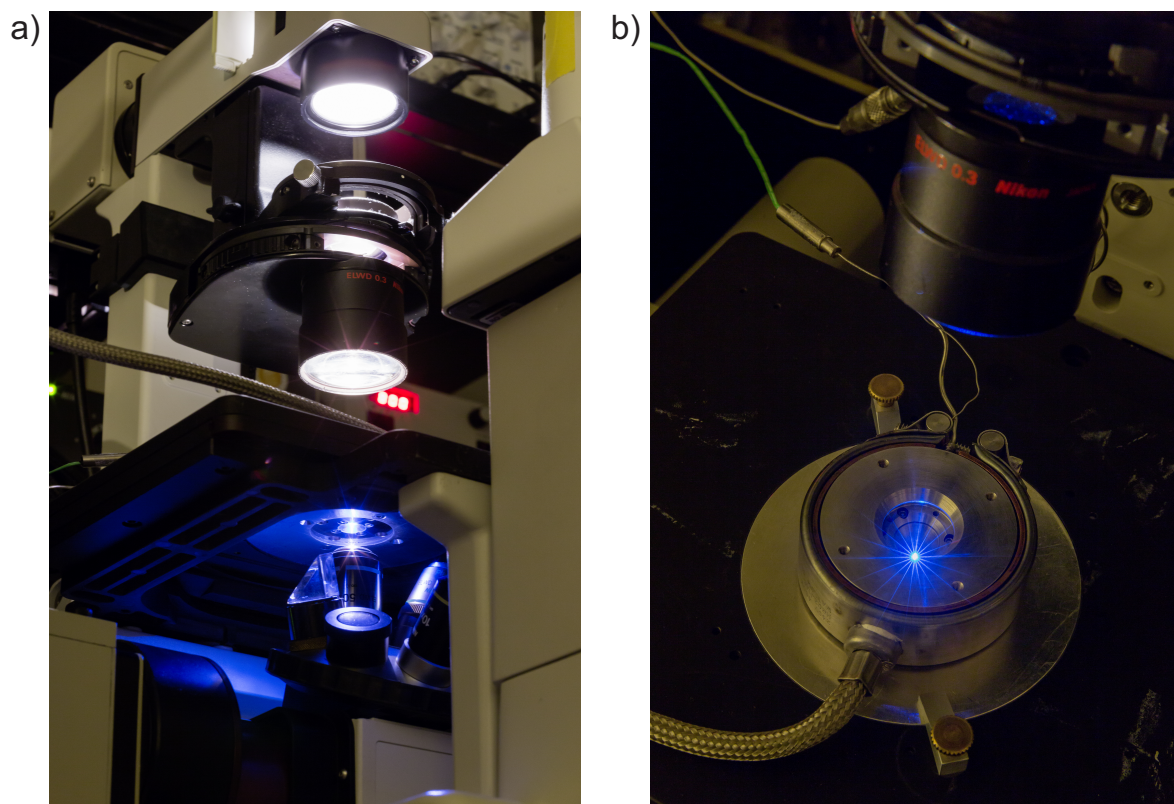
Als Quelle elektromagnetischer Strahlung zur Anregung von Fluoreszenz wurde eine 100 W Quecksilberdampf-Lampe des Mikroskops (Nikon HB-10104AF) verwendet. Der Strahlengang, der ausgesandten Strahlung, trifft zunächst auf einen Filterwürfel (Tab. 2.3), bestehend aus einem Anregungsfilter (ET Bandpass 545/25), einem Strahlteiler (Strahlteiler T 565 LPXR) und einem Emissionsfilter (ET Bandpass 605/70). Das gefilterte Licht zur Anregung der Fluoreszenz wird im folgenden Verlauf des Strahlengangs in das Objektiv des Mikroskops eingekoppelt. Anschließend wird das Anregungslicht auf die Probe in der Diamantstempelzelle fokussiert, die somit zur Fluoreszenz angeregt wird.

**Tabelle 2.3:** Optische Filter. Filter wurden von AHF Analysentechnik (Tübingen, Deutschland) bezogen.

Bezeichnung	Typ	$T_{\text{max}}^i$ / nm
ET Bandpass 545/25	Bandpass	535 - 556
Strahlteiler T 565 LPXR	Strahlteiler	570 - 650 / $R_{\text{max}}^{\text{ii}}$ : 425 - 555
ET Bandpass 605/70	Bandpass	573 - 636

<sup>i</sup> Bereich Transmission > 95 %    <sup>ii</sup> Bereich Reflexion > 95 %





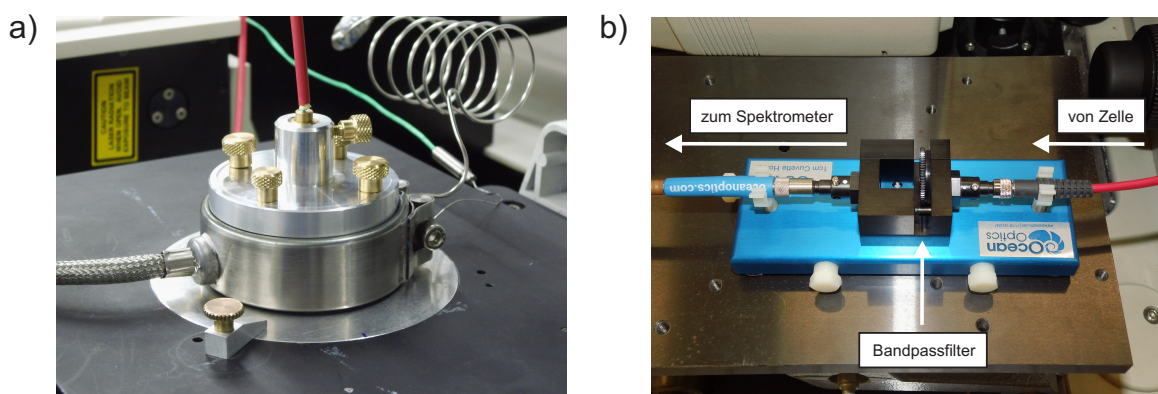
**Abbildung 2.5:** Diacell<sup>®</sup> VivoDAC auf dem Mikroskopietisch des Nikon Eclipse TE300 Mikroskops. Licht wird über das Objektiv unterhalb des Mikroskopietischs in die fokale Ebene der Probe in der Zelle fokussiert (a). Anregungswellenlängen und Emissionswellenlängen treten auf der oberen Seite der Hochdruckzelle wieder aus (b). Zur konstanten Temperierung der Zelle wird ein Bandheizer benutzt. Foto: Roland Baege.

An diesem Punkt teilt sich der Strahlengang, da die emittierte Strahlung wieder zurück in Richtung des Objektivs gelangen kann oder aus dem oberen Teil der Zelle austritt. Über den optischen Strahlengang des Objektivs trifft die emittierte Strahlung wieder auf den Filterwürfel, wodurch die reflektierte Anregungsstrahlung geblockt (Strahlteiler T 565 LPXR) und gleichzeitig die gewünschten Fluoreszenzemissionswellenlängen (ET Bandpass 605/70) herausgefiltert werden. Die resultierende Strahlung wird zum Okular des Mikroskops weitergeleitet, sodass die Fluoreszenz der Probe vom Anwender beobachtet werden kann. Bei herkömmlichen Fluoreszenzspektrometern wird die emittierte Strahlung üblicherweise in einem Winkel von  $90^\circ$  detektiert, damit die Anregungswellenlängen nicht ebenfalls auf den Detektor treffen. Diese Anordnung ist bei der Verwendung der Diamantstempelzelle Diacell<sup>®</sup> VivoDAC nicht möglich, da die Zelle keine optischen Fenster im rechten Winkel zur Probe aufweist. D.h. die Detektion der



emittierten Strahlung ist nur in Richtung des Strahlengangs, in der auch die Anregung der Fluoreszenz erfolgt, möglich (obere Zellöffnung). Aus dem oberen Teil der Zelle tritt somit sowohl Strahlung der Anregungswellenlängen als auch Strahlung der Emissionswellenlängen aus. Zunächst wird die gesamte Strahlung in einen Lichtleiter eingekoppelt, der direkt über dem Diamantstempel lokalisiert ist. Um einen möglichst großen Anteil der emittierten Strahlung der Probe in den Lichtleiter einzukoppeln, wurde dieser direkt oberhalb der Außenseite des Diamantstempels montiert. Die Außenseite des Diamantstempels auf der oberen Seite der Hochdruckzelle und die austretende Strahlung sind in Abbildung 2.5 b zu erkennen. Da der Diamantstempel an der Außenseite der Zelle einen sehr geringen zugänglichen Durchmesser aufweist, wurde der Lichtleiter an einem Ende vom Schutzmantel befreit. Des Weiteren wurde der SMA905-Anschluss entfernt, sodass ein poliertes Ende der Glasfaser offenliegt.

Zur optimalen Positionierung des Lichtleiters in unmittelbarer Nähe zur Außenseite des Diamantstempels wurde eine Halterung für den Lichtleiter angefertigt, die auf den oberen Teil der Zelle aufgeschraubt werden kann (Abb. 2.6 a). Da in den Lichtleiter sowohl Licht der Wellenlängen des Anregungslichtes, als auch emittierte Strahlung gelangen, werden vor der Detektion am Spektrometer die Anregungswellenlängen blockiert,



**Abbildung 2.6:** Die Fluoreszenz der Probe innerhalb der Hochdruckzelle kann aufgrund der Bauweise nur im selben Strahlengang detektiert werden in dem die Probe angeregt wird. Zur Detektion der Fluoreszenz der Probe wird die emittierte Strahlung und die Anregungswellenlängen direkt oberhalb des Diamantstempels durch einen Lichtleiter gesammelt (a) und gelangt über diesen zunächst zu einem Bandpassfilter, der die Anregungswellenlängen blockt (b). Die emittierte Strahlung der Probe gelangt durch den Bandpassfilter hindurch, wird wieder in einen Lichtleiter eingekoppelt und gelangt zum Spektrometer.

**Tabelle 2.4:** Fluoreszenzspektrometer - Ocean Optics Maya2000 Pro

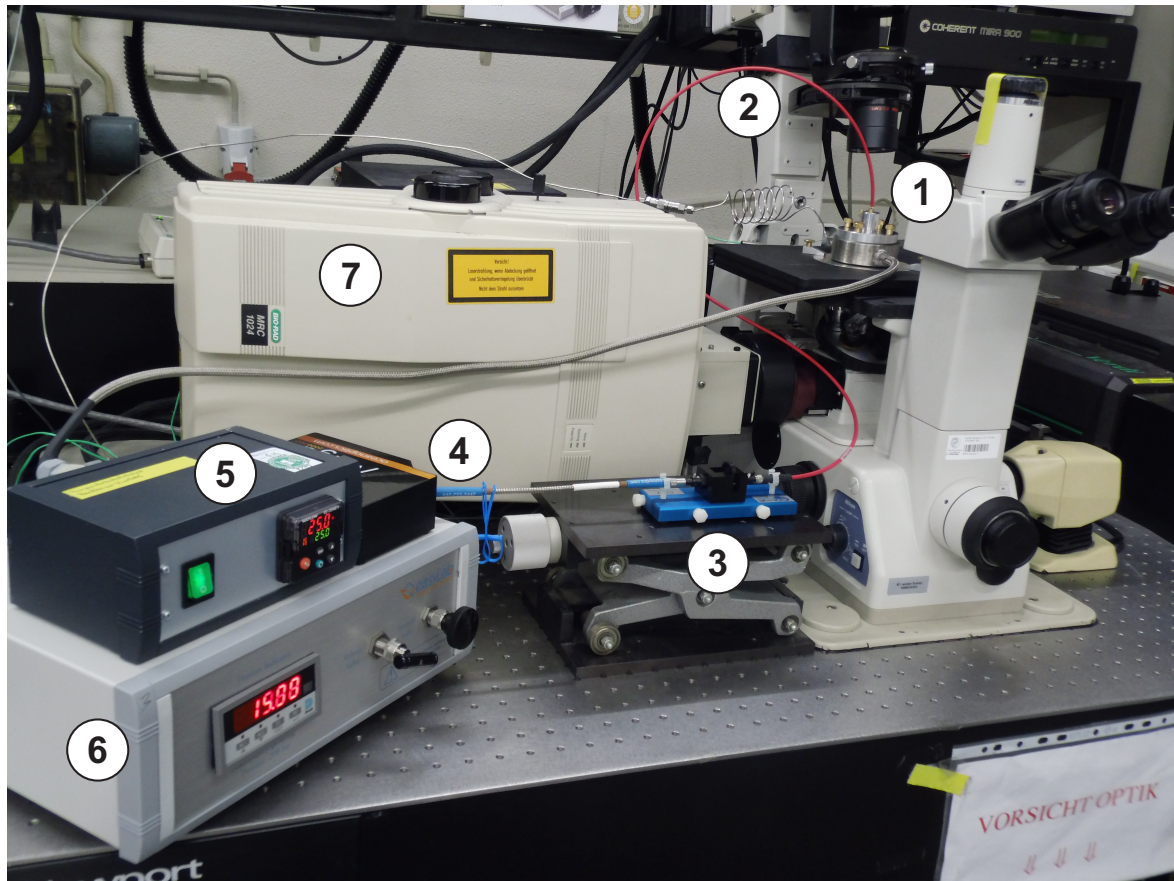
Eigenschaft	Spezifikation
Wellenlängenbereich	380 - 840 nm
Detektor	Hamamatsu S10420
Eingangsspalt	50 $\mu\text{m}$
Optische Auflösung	0.8 nm
Beugungsgitter	H1
Faseradapter	SMA905
Integrationszeit	7.2 ms - 5 s
Schnittstelle	USB
Software	SpectraSuite

indem das Licht auf einen Bandpassfilter (ET Bandpass 605 / 70) trifft, der nur die gewünschten Wellenlängen der emittierten Strahlung transmittiert (Abb. 2.6 b). Hierbei erfolgt die Auskopplung aus und die Einkopplung in die Lichtleiter jeweils über eine Kollimationslinse (74-UV) mit einem fokalen Abstand von 10 mm. Das in den Lichtleiter (QP600-025-SR-BX) wieder eingekoppelte Licht wird zu einem Spektrometer (Ocean Optics Maya2000 Pro) weitergeleitet (Tab. 2.4). Da sowohl das Probenvolumen als auch die Fluorophorkonzentration sehr gering ist, wird ein Spektrometer verwendet, das über ein hochsensitives CCD-Detektorarray verfügt und eine Quanteneffizienz von  $> 90\%$  gewährleistet.

**Tabelle 2.5:** Halterungen für optische Filter oder Küvetten. Halterungen und Quarzglaslinsen wurden von Acal BFI (Dietzenbach, Deutschland) bezogen.

Bezeichnung	Weglänge <sup>i</sup>	$d^{\text{ii}}$ / mm	Sammellinsen	Faseradapter
CUV-ALL-UV	1 cm	6.35 mm	Vier 74-UV Quarzglaslinsen (200 - 2000 nm)	SMA905
CUV-UV	1 cm	6.35 mm	Zwei 74-UV Quarzglaslinsen (200 - 2000 nm)	SMA905

<sup>i</sup> Optische Weglänge der aus dem Lichtleiter ausgekoppelten Strahlung    <sup>ii</sup> Maximale Schichtdicke des Filters



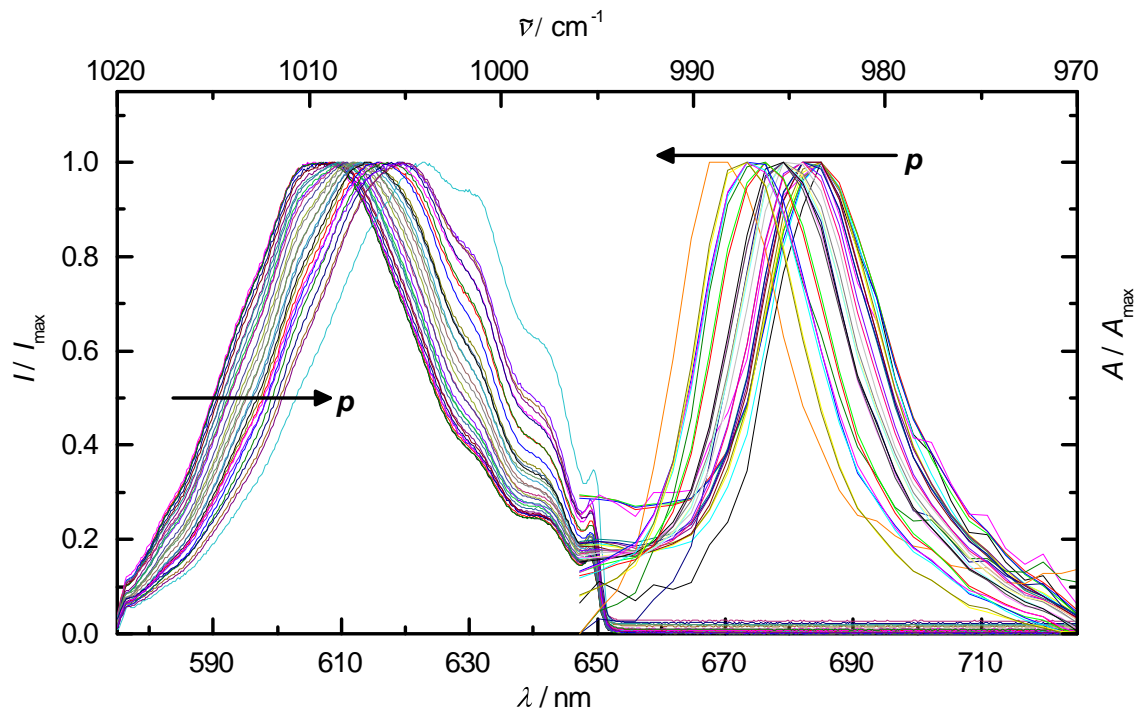
**Abbildung 2.7:** Foto des etablierten Messsystems. Diamantstempelzelle mit Bandheizer zur Temperierung (1), Lichtleiter zur Weiterleitung der emittierten Strahlung der Probe als auch des Anregungslichtes (2), Filterhalter mit eingesetztem optischen Filter zur Blockierung des Anregungslichtes (3), Spektrometer zur Detektion der emittierten Strahlung (4), Temperaturregler zur Steuerung des Bandheizers (5), manueller Druckregler (wahlweise kann hier auch das automatisierte Druckregelsystem GE PACE5000 eingesetzt werden) der Diamantstempelzelle (6), Detektor des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops Bio-Rad MRC-1024 (7).

## 2.2.4 FluoSpheres® als interner Druckindikator

Bei der Verwendung der Diamantstempelzellentechnik ist eine externe Druckmessung mit einem Manometer aufgrund des geringen Probenvolumens nicht möglich. Aus diesem Grund werden Substanzen benutzt, die eine druckabhängige Reaktion eines bestimmten Messsignals aufweisen (Tab. 2.6). Da das Ziel dieses Projektes u. a. die Einkoppelung einer Diamantstempelzelle in ein Fluoreszenzmikroskopiesystem war, wurde ein Druckindikator gewählt, der eine druckabhängige Veränderung der Fluoreszenzemission aufweist. Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, weisen z.B. FluoSpheres® der Firma Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) diese Eigenschaft auf.<sup>[149]</sup> Hierbei handelt es sich um kugelförmige Partikel, die aus Polystyrol bestehen und zusätzlich einen Fluorophor enthalten. Der Vorteil dieser kommerziell erhältlichen Partikel ist die große Vielfalt bzgl. Fluoreszenzanregung und -emission, Größe und chemischer Eigenschaften der Partikel. Da in zukünftigen Studien hauptsächlich die Laserlinien von 488 nm und 647 nm des Krypton-Argon-Lasers des Mikroskops zur Anregung der Probenfluoreszenz verwendet werden sollen, wurden dementsprechend FluoSpheres® mit einem Anregungsmaximum der Laserlinie 568 nm ausgewählt (FluoSpheres® F-8826). Des Weiteren wurde ein Durchmesser von 2 µm gewählt, da Partikel dieser Größe zu keiner schnellen Sedimentation neigen und innerhalb des Auflösungsbereiches des Mikroskops liegen.

**Tabelle 2.6:** Interne Druckindikatoren zur Verwendung in Diamantstempelzellen.

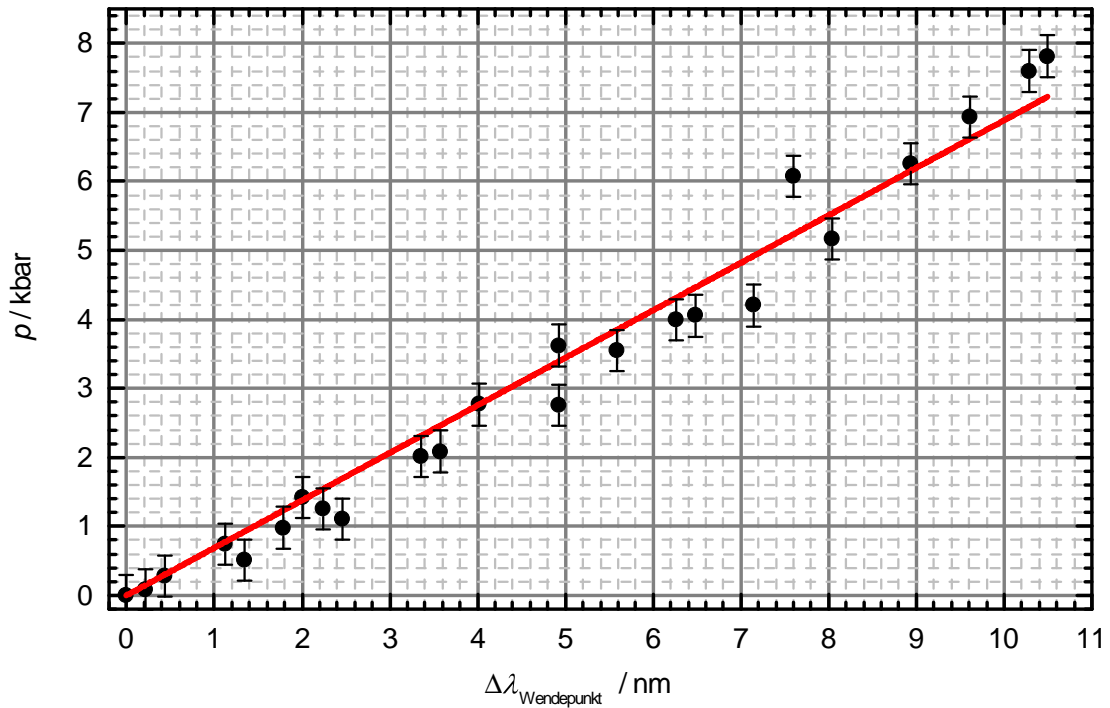
Substanz	Signal	Indikator	Druckregion	Genauigkeit
Cr <sup>3+</sup> : Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>[150]</sup>	Fluoreszenz-emission	Peakmaximum 694.2 nm	0 - 40 kbar	300 bar
α-Quartz <sup>[151]</sup>	IR-Absorption	Peakmaximum bei 695 cm <sup>-1</sup>	0 - 60 kbar	240 bar
BaSO <sub>4</sub> <sup>[145]</sup>	IR-Absorption	Peakmaximum bei 983 cm <sup>-1</sup>	0 - 48.4 kbar	150 bar
FluoSpheres® <sup>[149]</sup> F-21011, Ø = 15 µm	Fluoreszenz-emission	Peak-Wendepunkt bei 525.6 nm	0 - 20 kbar	200 bar



**Abbildung 2.8:** Druckabhängige Bandenverschiebung der Fluoreszenzemission von FluoSpheres® und der IR-Absorption von BaSO<sub>4</sub>. Die jeweiligen Peaks wurden auf das Signalmaximum normiert. FluoSpheres®: Normierte Fluoreszenzintensität  $I / I_{\max}$  vs. Wellenlänge  $\lambda$ . BaSO<sub>4</sub>: Normierte Absorption  $A / A_{\max}$  vs. Wellenzahl  $\tilde{\nu}$ . Die eingezeichneten Pfeile zeigen jeweils die Richtung der Bandenverschiebung mit steigendem Druck an.

Da diese Partikel somit, aufgrund ihrer Größe, neben den interessierenden Proben ebenfalls visualisiert werden können, ist es möglich sicherzustellen, dass keinerlei Interaktionen zwischen Probe und FluoSpheres® auftreten. Die Druckkalibrierung erfolgte anhand der bekannten druckabhängigen Verschiebung der symmetrischen SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Streckschwingung von BaSO<sub>4</sub> bei einer Wellenzahl von 983.4 cm<sup>-1</sup>.<sup>[145]</sup> In Abbildung 2.8 ist die druckabhängige Verschiebung der mittels FTIR-Spektrometer gemessenen Absorptionsbande von BaSO<sub>4</sub> und die korrespondierende druckabhängige Verschiebung der Fluoreszenzemission der verwendeten FluoSpheres®, die mittels des etablierten Fluoreszenzspektrometers detektiert wurde, dargestellt.

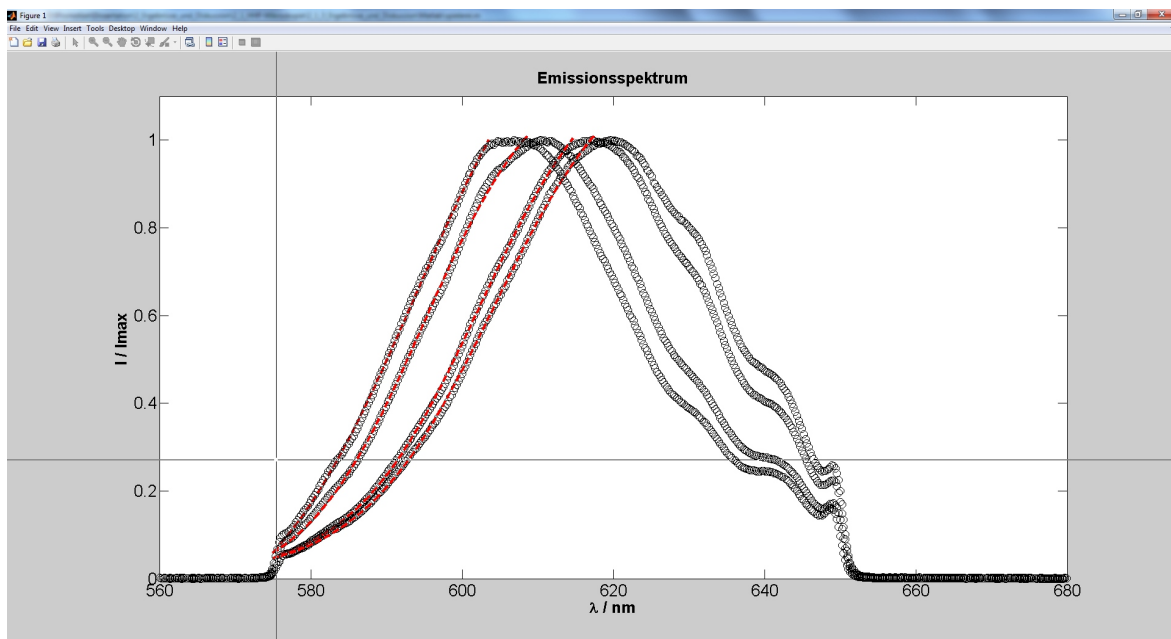
Zur Bestimmung von Wendepunkten der Emissionsspektren der FluoSpheres® wurde ein Programm mittels Matlab® R2009b geschrieben, das eine zügige Ermittlung des Wendepunktes während des Experiments ermöglicht. Hierzu wird das Emissionsspektrum zunächst aus der Software zur Steuerung des Fluoreszenzspektrometers (Spec-



**Abbildung 2.9:** Druckabhängige Verschiebung des Wendepunktes des Emissionsspektrums von FluoSpheres<sup>®</sup>. Die Druckkalibrierung der verwendeten Partikel anhand von BaSO<sub>4</sub> ergibt einen linearen Zusammenhang von Druck und Ordinatenverschiebung des ersten Wendepunktes (rote Linie) des Emissionsspektrums mit folgendem mathematischen Zusammenhang:  $p / \text{bar} = 688.5 \Delta\lambda$  ( $R^2 = 0.99$ ).

traSuite) exportiert und anschließend in das Programm importiert. Infolgedessen wird das Emissionsspektrum direkt graphisch dargestellt. Nun werden mit einem Fadenkreuz die Fitgrenzen bzgl. der  $x$ -Achse ausgewählt, indem sie direkt im Spektrum mit einem Klick der linken Maustaste festgelegt werden. Im Anschluss wird automatisch eine BOLTZMANN-Funktion an die Daten angepasst und der ermittelte Wendepunkt erscheint auf dem Bildschirm (Abb. 2.10).

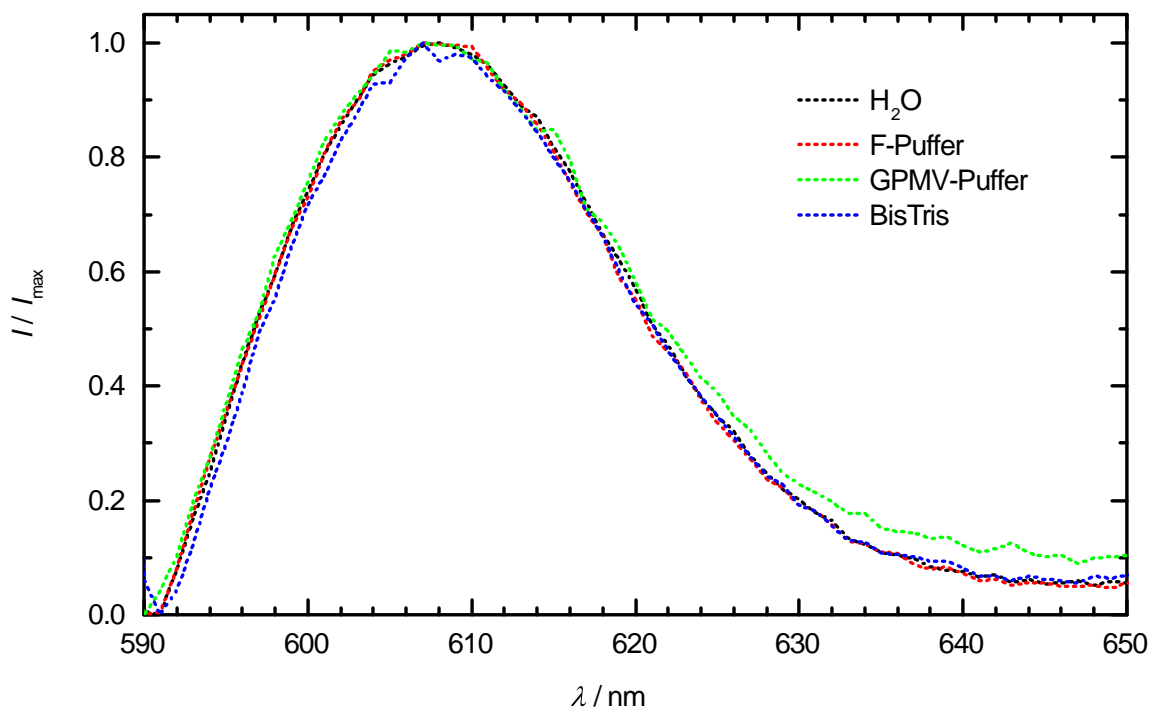




**Abbildung 2.10:** Matlab<sup>®</sup>-Programm zur Ermittlung des Wendepunktes von Emissionsspektren / Bestimmung des Drucks innerhalb der Diamantstempelzelle. Es sind vier Emissionsspektren der FluoSpheres<sup>®</sup> mit steigendem Druck (links nach rechts) und die zugehörigen Funktionsanpassungen (rot gestrichelte Linien) dargestellt. Mit dem Fadenkreuz werden die Fitgrenzen der  $x$ -Achse ausgewählt. Infolgedessen startet die automatische Fitprozedur und der Wendepunkt wird auf dem Bildschirm ausgegeben.

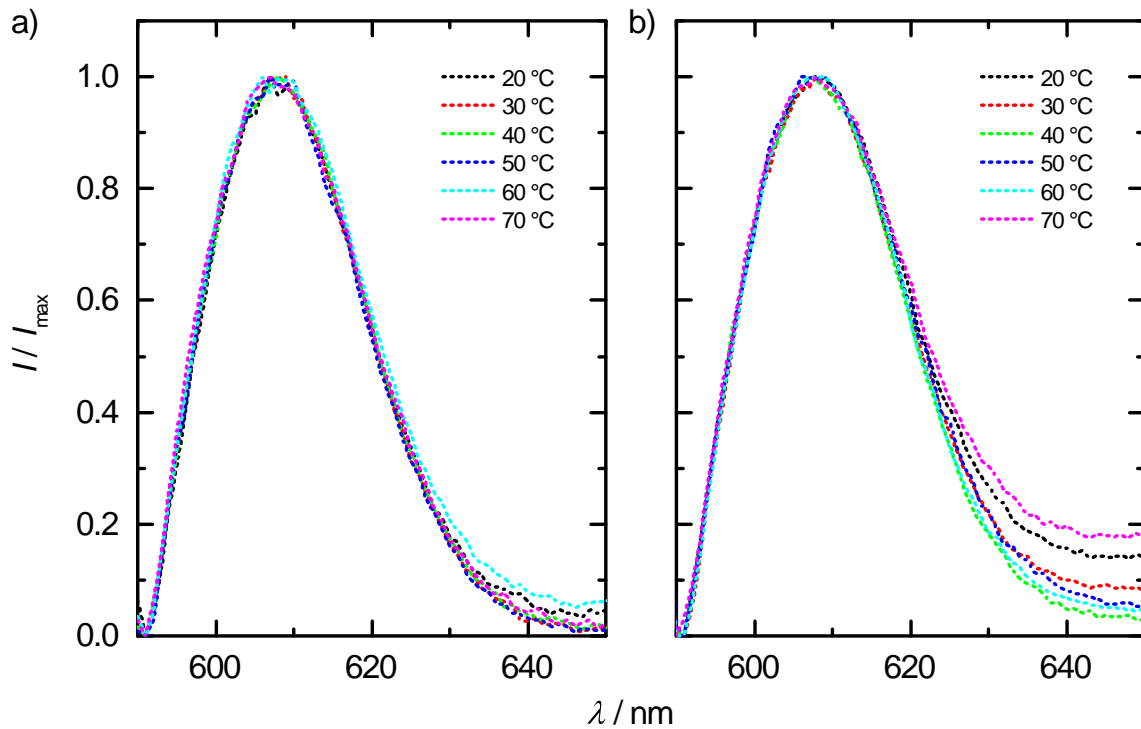
### **Einfluss von Temperatur, pH-Wert und verschiedenen Puffern auf das Emissionsspektrum von FluoSpheres®**

In dieser Arbeit wurde bereits die Druckabhängigkeit des Emissionsspektrums von FluoSpheres® und die damit verbundene Möglichkeit der Druckbestimmung innerhalb von Diamantstempelzellen dargestellt. Da die Analysebedingungen verschiedener Proben, wie z.B. Protein-, Lipid-, DNA- oder RNA-Lösungen, unterschiedliche Ansprüche bzgl. der Temperatur, des Puffers oder des pH-Werts des Puffers aufweisen, wurde die Abhängigkeit des Emissionsspektrums der verwendeten FluoSpheres® von diesen Größen experimentell ermittelt. Zur Durchführung wurde ein K2 Fluoreszenzspektrometer der Firma ISS verwendet. In Abbildung 2.11 sind die Emissionsspektren der FluoSpheres® in verschiedenen Puffern und den damit verbundenen pH-Werten dargestellt. Es wird klar ersichtlich, dass die verschiedenen Pufferbedingungen, wie



**Abbildung 2.11:** Emissionsspektren der verwendeten FluoSpheres® in verschiedenen Puffern und bidestilliertem Wasser. F-Puffer: 50 mM Tris-Cl, 10 mM Imidazol, pH 7.8, 10.6 mM ATP, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 2.4 mM DTT (Dithiothreitol), 1 mM NaN<sub>3</sub>; GPMV-Puffer: 10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>; BisTris: pH 7.0. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 20 °C und Atmosphärendruck durchgeführt.

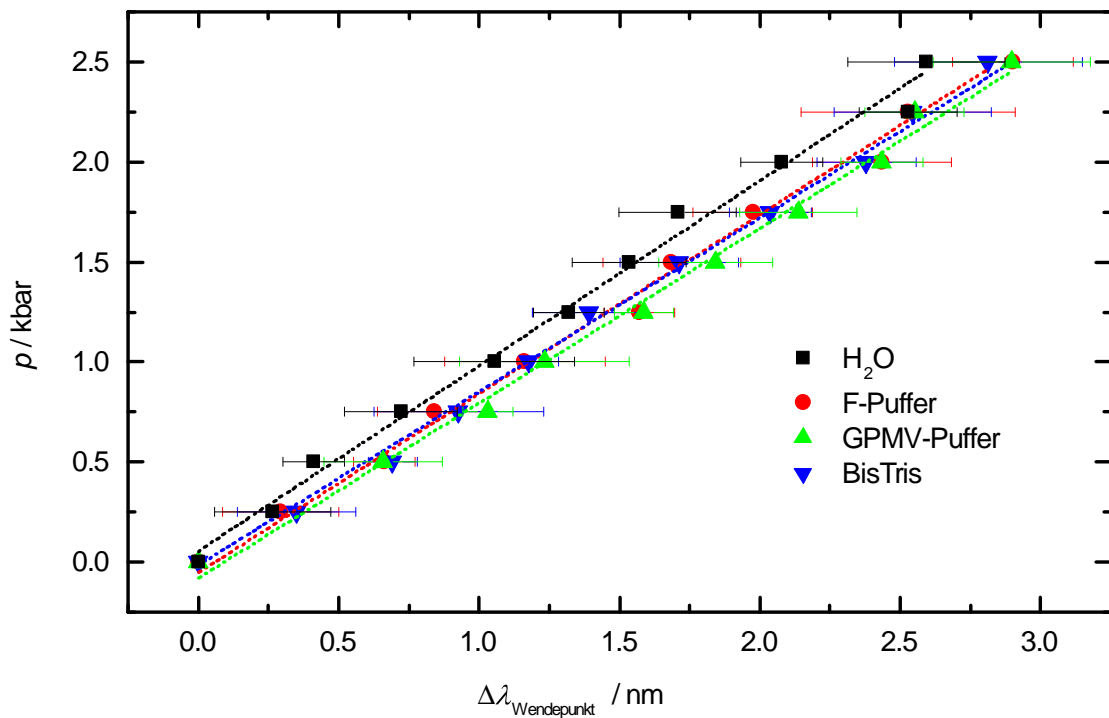




**Abbildung 2.12:** Emissionsspektren der verwendeten FluoSpheres® in BisTris pH 7.0 (a) und bidestilliertem Wasser (b) in Abhängigkeit der Temperatur bei Atmosphärendruck.

der pH-Wert, die Anwesenheit verschiedener Salze oder weiterer Substanzen, keinen signifikanten Einfluss auf das Emissionsspektrum aufweisen. Um die Auswirkung verschiedener Temperaturen auf das Emissionsspektrum der FluoSpheres® zu analysieren, wurden diese in einem Temperaturintervall von 20-70 °C gemessen. In Abbildung 2.12 sind die Spektren in Abhängigkeit der Temperatur in bidestilliertem Wasser und in BisTris-Puffer dargestellt. Eine ansteigende Temperatur hat ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen auf das Maximum oder den Wendepunkt der Emissionsspektrum dieser Partikel. Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern die druckabhängige Verschiebung des Wendepunktes abhängig von den Pufferbedingungen ist. In Abbildung 2.13 sind die druckabhängigen Ordinatenverschiebungen des Wendepunktes der Emissionsspektren von FluoSpheres® in H<sub>2</sub>O, F-Puffer, GPMV-Puffer und BisTris-Puffer dargestellt. Es wird ersichtlich, dass innerhalb des experimentellen Fehlers der Daten keine signifikanten Unterschiede der Steigung zu erkennen sind.

Die durchgeführten Studien deuten daraufhin, dass das Fluoreszenzemissionsspektrum der Partikel eine hohe Sensitivität gegenüber Druckveränderungen aufweist, wo-



**Abbildung 2.13:** Druckabhängige Verschiebung des Wendepunktes des Emissionsspektrums von FluoSpheres® in verschiedenen Puffern. Die zugehörigen linearen Funktionsanpassungen sind als gepunktete Linien dargestellt.

hingegen der pH-Wert, Temperatur oder Veränderungen der Pufferbedingungen keine signifikanten Auswirkungen aufweisen. Des Weiteren ist die druckabhängige Ordinatenverschiebung in allen gemessenen Puffern und Wasser im Rahmen des experimentellen Fehlers identisch. Somit sind die verwendeten FluoSpheres® ein idealer Druckindikator zur Verwendung in Diamantstempelzellen.

## 2.2.5 Automatisierung von Druckexperimenten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Verwendung eines manuellen Drucksteuerungssystem ein automatisiertes System der Firma General Electric (Frankfurt am Main, Deutschland) zur Steuerung der Diacell® VivoDAC installiert (GE PACE5000). Dieser pneumatische Druckregler besitzt eine vollständig digitale Regelung, um eine hohe Regelstabilität und Anstiegsgeschwindigkeit zu bieten. Die Fehlergrenzen der Messgenauigkeit dieses Gerätes liegen bei 0.02 % des Messwertes + 0.02 % des Endwertes und die der Regelgenauigkeit bei 0.005 % vom Endwert. Des Weiteren verfügt der

Druckregler zur Bedienung über einen berührungsempfindlichen Farbbildschirm. Im Folgenden wird die Benutzung des Druckregelsystems zur Regelung des Drucks innerhalb der Diamantstempelzelle Diacell® VivoDAC beschrieben. In Klammern werden ebenfalls die nötigen Befehle zur Eingabe über den Touchscreen des Gerätes genannt. Für detaillierte Informationen bzgl. der Menüführung und Bedienung des Druckregelsystems sei an dieser Stelle auf das Handbuch des Herstellers verwiesen.

Vor der Verwendung des Druckreglers erfolgte zunächst eine Belüftung des Systems (*Control Setup* → *Vent*). Anschließend wurde in den Basis-Modus des Gerätes gewechselt (*Measure Setup* → *Task* → *Basic*). In diesem Modus kann der zu applizierende Druck zunächst manuell eingegeben werden. Die Eingabe von 0 bar stellt sicher, dass kein Überdruck innerhalb des Systems vorhanden ist und somit kann nun die Kapillare der Diamantstempelzelle mit der Kapillare des Druckregelsystems verbunden werden. Nach erfolgtem Anschluss wird der Druck in 1 bar-Schritten auf einen Enddruck von 6 bar angehoben (Bsp.: *Setpoint* → *1 bar* → *Control*). Es wurde bei der Verwendung von Messing-Dichtungen (Dicke = 50 µm) empirisch festgestellt, dass ein Gasdruck von ~6 bar innerhalb der Membran der Zelle zu keinem Druckanstieg innerhalb der Probe führt, jedoch sichergestellt ist, dass die Zelle (Diamantstempel und Diamantfenster) dicht abschließt und somit ein Auslaufen der Probe verhindert wird. Eine weitere Erhöhung des Gasdrucks führt zu einem direkten Druckanstieg innerhalb der Probe. Nun wird ein Programm gestartet, das den Druck in kontrollierten Druck- und Zeitschritten automatisch erhöht. Tabelle 2.7 zeigt als Beispiel ein komplettes Programm, wie es zur Durchführung von druckabhängigen FTIR-spektroskopischen Messungen (z.B. Kapitel 3.2.2) verwendet wurde. Zunächst werden beim Start des Programms Werte für die Displayauflösung und Einheit des Drucks, die Bandbreite des Sollwertes und die Reglergeschwindigkeit initialisiert (Befehle 1 - 5). Im Anschluss pausiert das Programm (Befehl 6) und wartet auf eine Anwenderbestätigung zur Fortsetzung des Programms und somit den Start der eigentlichen Druckrampe (Befehle 7 - 21). Befehl 7 initialisiert den ersten Sollwert von 6 bar. In Befehl 8 wird die Regelung auf diesen Sollwert gestartet, die für 189 s (Befehl 10) andauert. Im Anschluss wird der Sollwert auf 6.2 bar erhöht und die Regelung für einen Zeitraum von 429 s gestartet (Befehle 10 - 12).

**Tabelle 2.7:** Programm - Automatisierte Druckrampe - GE PACE5000

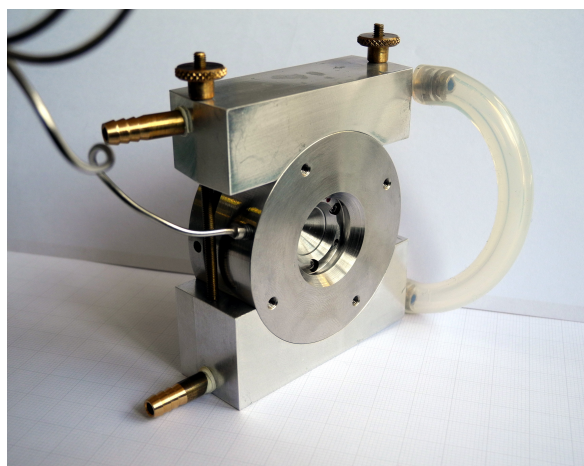
Nr.	Befehl	Bedeutung
1	START	Start des Programmablaufs
2	RESOLUTION = 4	Legt die Displayauflösung fest: 4 Dezimalstellen
3	UNITS = 1	Einheiten in bar
4	IN LIMITS = 10	Bandbreiteneinstellung: Bei Regelung wird eine Abweichung um 10 % vom Sollwert toleriert
5	RATE MAX	Stellt die Reglergeschwindigkeit auf den Maximalwert ein
6	PAUSE	Nach der erfolgten Initialisierung der bisherigen Befehle wartet das Programm auf eine Bestätigung des Anwenders
7	SETPOINT = 6	Initialisierung des Sollwertes von 6 bar
8	CONTROL	Start Druckregelung
9	DWELL = 189	Regelung des Drucks erfolgt für 189 s
10	SETPOINT = 6.2	Initialisierung des Sollwertes von 6.2 bar
11	CONTROL	Start Druckregelung
12	DWELL = 429	Regelung des Drucks erfolgt für 429 s
13-216	...	Weitere Erhöhung des Drucks in Schritten von 0.2 bar und Regelung für 429 s bis zu einem Wert von 19.8 bar
217	SETPOINT = 20.0	Initialisierung des Sollwertes von 20 bar
218	CONTROL	Start Druckregelung
219	DWELL = 429	Regelung des Drucks erfolgt für 429 s
220	SETPOINT = 0.0	Initialisierung des Sollwertes von 0 bar
221	CONTROL	Start Druckregelung
222	DWELL = 60	Regelung des Drucks erfolgt für 60 s
223	VENT	System wird belüftet
224	END	Ende des Programms

In den Befehlen 13-216 wird der Druck in Schritten von 0.2 bar bis auf 19.8 bar erhöht, wobei der jeweilige Gasdruck für 429 s geregelt wird. Im Anschluss wird ein Sollwert von 20 bar initialisiert und ein letztes Mal für 429 s geregelt (Befehle 217 - 219). Zuletzt wird der Sollwert auf 0 bar reduziert, für 60 s geregelt und infolgedessen kann das System belüftet werden (Befehle 220 - 223). Befehl 224 beendet das Testprogramm. Das in Tabelle 2.7 dargestellte Testprogramm des GE PACE5000 kann in Kombination mit der Diamantstempelzelle Diacell<sup>®</sup> VivoDAC für druckabhängige FTIR-spektroskopische Messungen verwendet werden. Um einen automatisierten Ablauf zu gewährleisten, werden die Softwareeinstellungen des Spektrometers und des Testprogramms einander angeglichen.

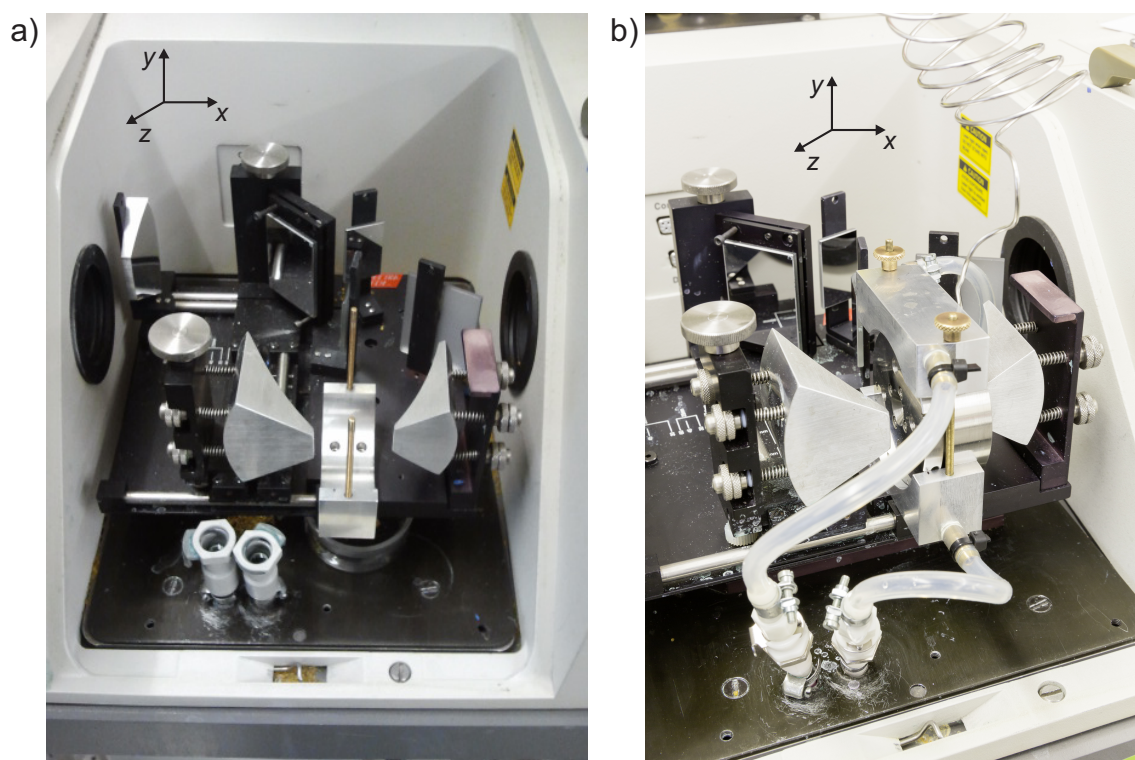
### **Automatisierung von druckabhängigen FTIR-spektroskopischen Messungen**

Zur Durchführung von druckabhängigen Messungen mittels Diamantstempelzellen im infraroten Bereich elektromagnetischer Strahlung wird ein FTIR-Spektrometer MAGNA 550 der Firma Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet. In dieses Gerät wurde bereits in früheren Arbeiten ein Spiegelsystem eingebaut, das die Messungen in manuellen Diamantstempelzellen ermöglicht (Abb. 2.15). Dieses Strahlkondensorsystem fokussiert zunächst die einfallende Strahlung auf das kleine Probenvolumen der Diamantstempelzelle und im Anschluss erfolgt eine Fokussierung der austretenden Strahlung auf den Detektor des Gerätes. Um Messungen mittels der vorgestellten Diamantstempelzelle Diacell<sup>®</sup> VivoDAC durchzuführen, wurde zunächst eine temperierbare Halterung angefertigt, die die Einkopplung dieser Zelle in das Spektro-

**Abbildung 2.14:** Diacell<sup>®</sup> VivoDAC der Firma Almax easyLab eingesetzt in die angefertigte, temperierbare Halterung zum Einsatz in einem FTIR-Spektrometer.



meter ermöglicht (Abb. 2.14). Diese Halterung kann in das Strahlkondensorsystem des Spektrometers eingebracht werden, damit die in der Diamantstempelzelle befindliche Probe analysiert werden kann. Hierzu wird zunächst der untere Teil der Halterung zwischen den beiden Parabolspiegeln des Strahlkondensorsystems platziert (Abb. 2.15 a). Anschließend kann die Diamantstempelzelle in den unteren Teil der Halterung gelegt und mittels des oberen Teils der Halterung fixiert werden (Abb. 2.15 b). Somit ist die Zelle in  $y$ - und  $z$ -Orientierung optimal durch die Halterung positioniert. Zuletzt wird das Signal optimiert, indem eine Justierung in  $x$ -Orientierung erfolgt. Hierzu wird der Detektor des Gerätes mit flüssigem Stickstoff befüllt und anschließend kann die Interferogrammintensität über die zugehörige Software angezeigt werden. Dieser Wert kann nun durch manuelles Verschieben der Zelle in  $x$ -Orientierung optimiert werden.



**Abbildung 2.15:** Strahlkondensorsystem der Firma PIKE Technologies (Madison, WI, USA) im Probenraum des FTIR-Spektrometers Magna 550 (a). Zwischen den beiden Parabolspiegeln ist die untere Hälfte der temperierbaren Halterung der Diamantstempelzelle bereits eingebaut. Nach dem Einsetzen der Zelle wird der obere Teil der Zellhalterung mittels zweier Rändelmuttern montiert und somit die Zelle im Strahlengang fixiert (b). Zur Temperierung der Zelle wird ein Wasserbad angeschlossen.

Nach optimaler Justierung können nun Spektren, der in der Diamantstempelzelle befindlichen Probe, gemessen werden. Um eine automatisierte Druckrampe ablaufen zu lassen, müssen die Einstellungen der Spektrometersoftware (OMNIC 7.2) bzgl. der Parameter Spektrenanzahl zur Mittelung, Gesamtanzahl an Spektren, Wartezeit zwischen der Aufnahme zweier Spektren, mit denen des verwendeten Programms des Druckregelsystems GE PACE5000 abgeglichen werden. Erfolgt die Aufnahme eines Spektrums basierend auf der Mittelung von 256 Einzelspektren, benötigt das Gerät hierzu exakt 189 s. Das in dieser Arbeit geschriebene und verwendete Programm (Tab. 2.7) ist auf diesen Wert abgestimmt. Des Weiteren wurde eine Äquilibrierungszeit des Drucks von 240 s verwendet. Somit ergibt sich für die Äquilibration und Spektrenaufnahme ein Zeitintervall von 429 s, wobei für das erste Spektrum der Druckrampe die Äquilibration manuell bzw. vor dem Start des Programms erfolgt (vgl. Tab. 2.7). In den Softwareeinstellungen der Spektrometersoftware werden unter „*Series* → *Series Setup*“ diese Einstellungen berücksichtigt, indem die in Tabelle 2.8 dargestellten Parameter eingegeben werden.

**Tabelle 2.8:** Einzustellende Parameter im „*Series Setup*“ der Spektrometersoftware OMNIC 7.2 zur Synchronisation mit dem Programm des automatischen Druckregelsystems.

Parameter	Wert
No. of scans per spectrum	256
Total collection time	30888 s
Repeat time	429 s
Resolution	2 cm <sup>-1</sup>
Velocity	0.9494 cm s <sup>-1</sup>

Nach der in Kapitel 2.2.2 dargestellten Vorbereitung und Assemblierung der Hochdruckzelle, wird diese in das FTIR-Spektrometer eingesetzt und mit dem Druckregelsystem verbunden. Der Gasdruck wird, wie am Anfang dieses Kapitels beschrieben, zunächst manuell in 1 bar-Schritten auf einen Enddruck von 6 bar erhöht. Anschließend wird das Testprogramm des GE PACE5000 (Tab. 2.7) gestartet. Das Programm initialisiert nun Befehle 1-6 und pausiert, wobei auf dem Display des Gerätes der

Button „Continue“ erscheint. An diesem Punkt wird die Serienaufnahme des FTIR-Spektrometers mit den zuvor eingegebenen Parametern gestartet (Tab. 2.8). Im direkten Anschluss an den Start der Serienaufnahme wird das Programm des Druckreglers weitergeführt, indem der „Continue“-Button betätigt wird. Ab diesem Zeitpunkt läuft die vollautomatische druckabhängige Messung.

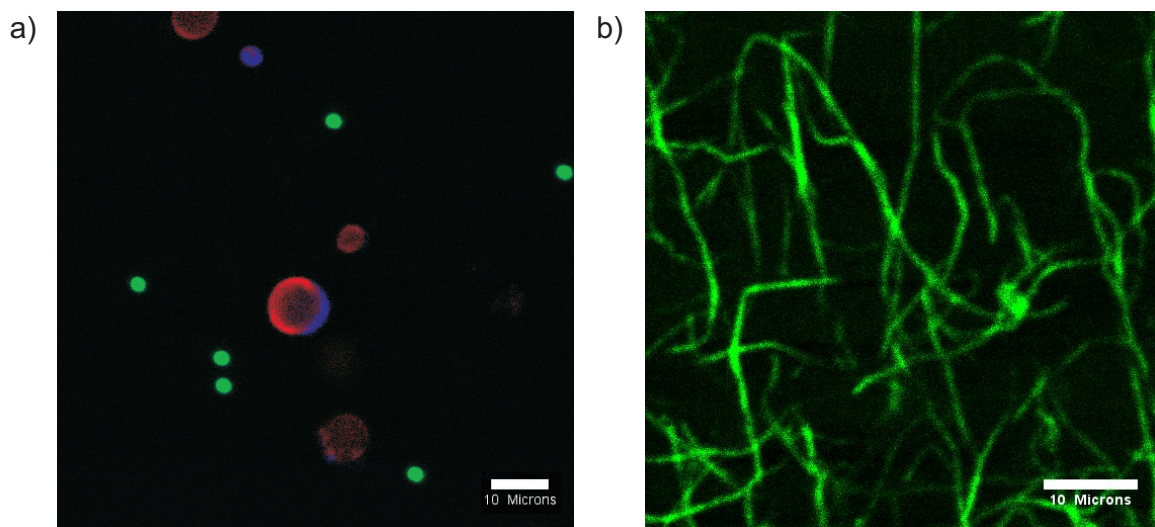
## 2.2.6 Testmessungen des Hochdruckmesssystems

Um das Auflösungsvermögen und die Bildqualität innerhalb der Diamantstempelzelle und unter Verwendung des Trockenobjektivs mit einem extralangen Arbeitsabstand beurteilen zu können, wurde zunächst eine Probe GPMVs (Giant plasma membrane-derived vesicles) mikroskopiert, da die Untersuchungen dieser Modellmembransysteme Teil aktueller und zukünftiger Forschungen sind. Bei dieser Probe handelt es sich um ein Membransystem, das direkt aus lebenden Zellen extrahiert wird und somit eine physiologische Lipidzusammensetzung aufweist. Abhängig von der Lipidkomposition können  $L_d$ - und  $L_o$ -Phase in diesen Vesikeln koexistieren.<sup>[152]</sup> Für detaillierte Informationen bzgl. der Herkunft und Präparation dieser Vesikel sei an dieser Stelle auf folgende Literaturstelle verwiesen:<sup>[153]</sup> Abbildung 2.16 a zeigt eine Aufnahme von GPMVs innerhalb der Hochdruckzelle. Die Lipidphasen wurden durch Fluorophore, die sich spezifisch in  $L_d$ - und  $L_o$ -Phase einlagern, markiert. Zudem wurde der Probe der interne Druckindikator, FluoSpheres<sup>®</sup>, zugegeben, um eine Interaktion dieser Partikel mit der Probe auszuschließen. Es ist ersichtlich, dass das Auflösungsvermögen innerhalb der Diamantstempelzelle ausreichend hoch ist, um diese Art von Vesikeln zu studieren. Des Weiteren konnte sichergestellt werden, dass keinerlei Interaktionen von FluoSpheres<sup>®</sup> und der Probe auftreten. Es konnte ebenfalls dargestellt werden, dass auch Aktinbündel innerhalb der Diamantstempelzelle visualisiert werden können (Abb. 2.16 b). Die Herstellung dieser Bündel erfolgte wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Hier wurde allerdings  $\alpha$ -Aktin verwendet, das mit dem Fluorophor Atto488 gelabelt und von der Firma HYPERMOL (Bielefeld, Deutschland) bezogen wurde.

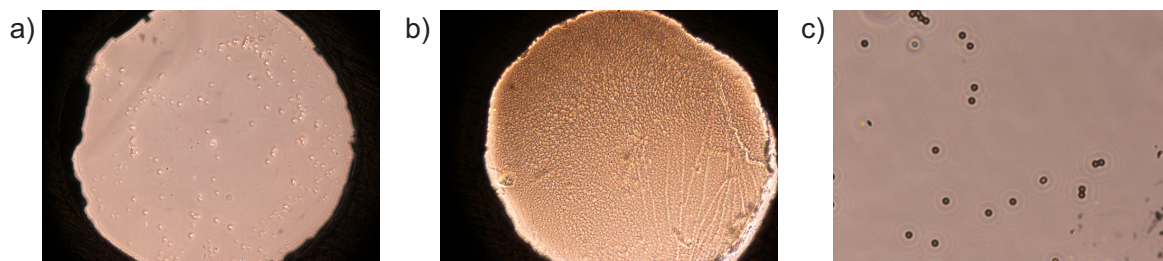
Zur Visualisierung druckabhängiger Veränderungen der Struktur einer Probe wurde zunächst Wasser verwendet. Es ist bekannt, dass Wasser bei einer Temperatur von 10 °C ab einem Druck von etwa 7.5 kbar von der flüssigen Phase direkt in die Eis VI-Phase



übergeht.<sup>[154]</sup> Abbildung 2.18 zeigt zwei Videos. Zum einen wurde der in weniger als einer Sekunde auftretende Übergang von der flüssigen Phase in die Eis VI-Phase bei einer Temperatur von 10 °C und einem Drucksprung von 7 kbar auf 8 kbar visualisiert und zum anderen wurde der Druck im Anschluss abrupt auf 1 bar reduziert. Es ist zu erkennen dass der Anstieg des Drucks auf 8 kbar direkt die Bildung der Eis VI-Phase zur Folge hat. Wird der Druck auf 1 bar reduziert, wird ebenfalls innerhalb von weniger als einer Sekunde nach Druckentspannung die flüssige Phase zurückgebildet. Diese Effekte sind ebenfalls in Abbildung 2.17 dargestellt.



**Abbildung 2.16:** Aufnahmen von GPMVs (a) und Aktinbündeln (b) mittels CLSM innerhalb der Diamantstempelzelle bei 20 °C und 1 bar (a). Zur spezifischen Markierung der  $L_d$ - und  $L_o$ -Phase wurden die Fluorophore NBD-DHPE ( $L_o$ -Phase, rot) und N-Rh-DHPE ( $L_d$ -Phase, blau) verwendet. Zudem wurde der Probe der interne Druckindikator, FluoSpheres<sup>®</sup>, zugegeben (grün). Maßstäbe: 10  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 2.17:** Phasenkontrastmikroskopie von Wasser innerhalb der Diamantstempelzelle bei 1 bar (a) und 8 kbar (b) bei einer Temperatur von 10 °C. Als Druckindikator wurden FluoSpheres<sup>®</sup> (helle punktförmige Stellen in Teilabbildung a) mit einem Durchmesser von 2  $\mu\text{m}$  hinzugegeben (c).

**Abbildung 2.18:** Videoaufnahmen der Bildung der Eis VI-Phase von Wasser nachdem der Druck von 7 kbar auf 8 kbar erhöht wurde und bei Druckentspannung (8 kbar auf 1 bar). Temperatur: 10 °C. Helle kugelförmige Stellen sind FluoSpheres<sup>®</sup>. Videos können nur im PDF-Format abgespielt werden.

### 2.2.7 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In diesem Projekt wurde eine kommerziell erhältliche membrangetriebene Diamantstempelzelle (Diacell<sup>®</sup> VivoDAC) der Firma easyLab in Betrieb genommen. Hierbei wurde zunächst der Assemblierungsprozess der Zelle standardisiert, sodass diese nach Assemblierung dicht abschließt, allerdings noch kein Druck innerhalb der Probe aufgebaut wird. Im Folgenden wurde die Hochdruckzelle in ein FTIR-Spektrometer inkorporiert, um mittels eines bekannten internen Druckindikators ( $\text{BaSO}_4$ , druckabhängige IR-Absorptionsbande) die Druckbestimmung innerhalb der Zelle zu ermöglichen. Mittels IR-Spektroskopie ergibt sich zusätzlich die Möglichkeit der druckabhängigen Analyse von Molekülschwingungen und somit können beispielsweise druckabhängige Untersuchungen der Sekundärstrukturänderungen von Proteinen oder Phasenübergänge von Lipiden durchgeführt werden. Da für derartige Experimente für eine exakte Auswertung optimaler Weise kleine Druckschritte gewählt werden, sind druckabhängige IR-Messungen sehr zeitaufwendig. Aus diesem Grund wurde in diesem Projekt ebenfalls ein kommerziell erhältliches, vollautomatisches Druckregelsystem (GE PACE5000) installiert. Zu diesem Zweck wurde ein Programm zur Steuerung des Druckreglers geschrieben und erprobt, das den genauen Ablauf der Druckrampe festlegt. Dieses automatisierte Messsystem bietet neben der Reduzierung der nötigen Arbeitszeit für die Durchführung einer Druckrampe ebenfalls erstmals die Möglichkeit Druckrampen ohne die Anwesenheit des Experimentators durchzuführen (z.B. über Nacht), sodass in selber Zeit wesentlich mehr Daten generiert werden können. Zur Etablierung eines Hochdruckmikroskopiesystems wurde aus Gründen der Durchführbarkeit davon abgesehen für jede Druckbestimmung ein IR-Spektrum zur Messung der druckabhängigen Verschiebung der Absorptionsbande von  $\text{BaSO}_4$  zu messen. Hierzu wurde ein interner Druckindikator etabliert, dessen druckabhängiges Signal an Ort und Stelle, also direkt auf dem Mikroskopietisch messbar ist: FluoSpheres<sup>®</sup>. Diese im Durchmesser  $2\text{ }\mu\text{m}$  großen fluoreszierenden Partikel wurden anhand der bekannten druckabhängigen Signalverschiebung von  $\text{BaSO}_4$  kalibriert, da dessen Fluoreszenzemissionsbande ebenfalls eine starke Druckabhängigkeit aufweist und zudem der Wendepunkt der Emissionsbande linear und bathochrom mit steigendem Druck verschiebt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Emissionsspektrum dieser Partikel keinerlei Sensitivität gegenüber Temperaturer-

---

höhungen, verschiedener Puffer und pH-Werte aufweist. Zur Messung von Fluoreszenzspektren wurde ein modular aufgebautes Spektroskopiesystem etabliert und in ein vorhandenes konfokales Laser-Raster-Mikroskop (Nikon Eclipse TE300) integriert, das zudem auch mobil ist, sodass eine spätere Inkorporation in ein Phasenkontrastmikroskop (Nikon Eclipse TE2000-U) problemlos möglich war. Zur schnellen Ermittlung von druckabhängigen Verschiebungen des Wendepunktes der jeweiligen Emissionsspektren der verwendeten FluoSpheres<sup>®</sup> wurde mittels Matlab<sup>®</sup> ein Programm geschrieben, das nach Einlesen des jeweiligen Emissionsspektrums automatisiert den Wendepunkt bestimmt und im Anschluss den zugehörigen Druck ausgibt, sodass während des eigentlichen Experiments hierzu keine Zeit aufgewendet werden muss.



## 3 Faltungsstabilität von Aktinstrukturen

### 3.1 Einleitung und Zielsetzung

Den größten Anteil der Biosphäre der Erde stellen die Ozeane mit einer durchschnittlichen Tiefe von etwa 3800 m und einer maximalen Tiefe von bis zu 11000 m (Marianengraben) dar. Eine Vielzahl an Meeresorganismen sind somit einem durchschnittlichen Druck von 380 bar ausgesetzt, der das 380-fache des Atmosphärendrucks darstellt, der an der Erdoberfläche herrscht.<sup>[9]</sup> Die Entdeckung piezo-, psychro- und thermophiler Organismen, dessen natürliche Habitate einen hohen hydrostatischen Druck und niedrige oder sehr hohe Temperaturen aufweisen, hat neue Fragen bzgl. der Strategien der Organismen in Bezug auf die Mechanismen, die zu derartigen Druck- und Temperaturreisistenzen führen, aufgeworfen.<sup>[11]</sup> In der Vergangenheit wurde der Effekt hoher hydrostatischer Drücke an einer Vielzahl einfacherer biomolekularer Systeme, wie Lipiddoppelschichten oder monomerer Proteine studiert.<sup>[12,129,138,155,156]</sup> In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die Druckstabilität von Proteinen im Wesentlichen auf folgenden Eigenschaften beruht:<sup>[111]</sup>

1. Ein geringes Volumen der Hohlräume innerhalb des Proteins, die durch imperfekte Packung der Aminosäuren entstehen
2. Eine geringe hydrophobe Oberfläche, die für Solvensmoleküle zugänglich ist (SASA)
3. Ein geringer Anteil an Ionenpaaren innerhalb oder zwischen Aminosäureresten oder Untereinheiten
4.  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäuren (*stacking effect*)

Untersuchungen von Druckeffekten auf komplexere biomolekulare Prozesse, wie metabolische oder Signalweiterleitungsprozesse und Polymerisationsreaktionen, sind sehr selten. Tatsächlich gehören Biomembranen (Lipiddoppelschichten) und Polymerisationsreaktionen zu den drucksensitivsten Strukturen.<sup>[157–162]</sup> Bereits im Jahre 1966 führten Ikkai und Ooi erste Untersuchungen des Druckeffekts auf Aktin durch.<sup>[161]</sup> Diese Studie hat gezeigt, dass G-Aktin instabiler gegenüber Druck ist im Vergleich zu Aktinfilamenten und folgerten weiterhin, dass Druck das Gleichgewicht der G-zu-F-Transformation in Richtung der monomeren Spezies verschiebt. Ikkai und Ooi konnten ebenfalls einen stabilisierenden Effekt von ATP-gebundenem im Vergleich zu ADP-gebundenem Aktin und Mg-G-Aktin im Vergleich zu Ca-G-Aktin nachweisen.<sup>[160]</sup> 1985 erforschten Swezey und Somero die Druckstabilität verschiedener  $\alpha$ -Aktin-Isoformen von Organismen, dessen natürliche Habitate Unterschiede in Bezug auf Temperatur und Druck aufweisen.<sup>[159]</sup> Diese Arbeit hat gezeigt, dass druckinduzierte Volumenänderungen des Proteins, die während des Entfaltungsprozesses auftreten, für Aktin-Isoformen aus Organismen, die gewöhnlicherweise bei Atmosphärendruck vorkommen, im Vergleich zu Isoformen von Tiefseeorganismen größer ausfallen. Ikeuchi et al. haben die Volumenänderungen von G- und F-Aktin zu -72 und -67 mL mol<sup>-1</sup> bestimmt, sodass die Packung der beiden Spezies relativ identisch zu sein scheint.<sup>[158]</sup>

Die Applikation hoher Drücke auf Organismen, dessen natürliches Habitat die Erdoberfläche darstellt, resultiert generell in signifikanten Veränderungen der Morphologie und Aktivität dieser Zellen. So haben *in vivo*-Studien gezeigt, dass hohe Drücke zur Zerstörung von Mikrotubuli und Dissoziation von Aktinfilamenten führen.<sup>[163–167]</sup> Weiterhin korreliert eine Reduzierung von Aktinstressfasern mit der Morphologie von Zellen, da diese u.a. für die mechanische Stabilität der Zelle sorgen.<sup>[168]</sup> Im Falle des Organismus *Saccharomyces cerevisiae* konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Organisation von Strukturen des Zytoskeletts sehr drucksensitiv ist und bereits bei Drücken von etwa 1 kbar gestört wird. Bei derartigen Drücken werden Aktinbündel in Knospen von Zellen bereits zerstört, wobei kleinere Aktinstrukturen zurückbleiben können.<sup>[164]</sup>

In Projekt 3.2 - **Untersuchungen der Stabilitätsgrenzen von G-Aktin und Aktin-Suprastrukturen** soll die Struktur und Faltungsstabilität von monomerem

(G), filamentösem (F) und gebündeltem (B) Aktin in einem großen Temperatur- und Druckbereich mittels FTIR-Spektroskopie in Kombination mit dynamischer Differenzkalorimetrie und Druck-Perturbations-Kalorimetrie, Röntgenkleinwinkelstreuung, konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie studiert, sodass schlussendlich das  $p, T$ -Phasendiagramm der verschiedenen Aktinspezies erstellt werden kann. Das Ziel ist ein tieferes, mechanistisches Verständnis der temperatur- und druckabhängigen Faltungsstabilität dieser Proteinstrukturen und somit eine Erklärung für die limitierte Druckstabilität von Aktinstrukturen *in vivo* zu erhalten.

Neben Druck und Temperatur stellen die chemischen Eigenschaften und zellulären Konzentrationen an natürlichen Osmolyten einen wesentlichen Parameter dar, der für die Faltungsstabilität von Proteinen *in vivo* maßgeblich ist. Organische kompatible Osmolyte sind kleine Solute, die u. a. von Wasserorganismen hergestellt werden, um z.B. dem osmotischen Druck entgegenzuwirken und somit das Zellvolumen aufrechterhalten zu können.<sup>[5]</sup> Kompatible Osmolyte werden ebenfalls von piezo-, psychro- oder thermophilen Organismen akkumuliert.<sup>[6]</sup> Zu den in Zellen akkumulierten Osmolyten gehören z.B. Aminosäuren, Polyole, Zucker, Methylamine und Harnstoff, wobei Harnstoff nicht zu den kompatiblen Osmolyten zählt, da es eine Störung von in der Zelle befindlichen Makromolekülen hervorrufen kann.<sup>[121,169]</sup> Einige kompatible Osmolyte haben einzigartige Eigenschaften und fungieren beispielsweise als Antioxidantien oder stellen Redoxgleichgewichte her; wiederum andere dienen der Zelle zur Stabilisierung der nativen Faltung von Proteinen oder Ligandenbindung und wirken Störungen von Harnstoff, einem natürlichen Endprodukt des Harnstoffzyklus, anorganischen Ionen oder hohen hydrostatischen Drücken entgegen.<sup>[112,170]</sup>

In Projekt 3.3 - **Einfluss von Cosolventien auf die Temperatur- und Druckstabilität von F-Aktin** sollen die natürlichen Osmolyte TMAO und Harnstoff hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Faltungsstabilität von Aktinfilamenten, einem wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts, untersucht werden. Hierzu sollen FTIR-spektroskopische Untersuchungen und Analysen der Sekundärstruktur des Proteins in Kombination mit kalorimetrischen Studien in einem großen Temperatur- und Druckbereich durchgeführt werden.



## 3.2 Untersuchungen der Stabilitätsgrenzen von G-Aktin und Aktin-Suprastrukturen

### 3.2.1 Material und Methoden

#### Materialien und Probenpräparation

$\alpha$ -Aktin und TMR- $\alpha$ -Aktin ( $\alpha$ -Aktin mit Tetramethylrhodamin gelabelt an Aminosäure Cystein 374), isoliert aus Kaninchenmuskelzellen, wurden von HYPERMOL (Bielefeld, Deutschland) bezogen. Da G-Aktin ab einer Konzentration von  $\sim 5 \text{ mg mL}^{-1}$  ohne die Zugabe von Salzen bzw. erhöhter Ionenstärke polymerisieren kann, wurde ab einer Proteinkonzentration  $> 5 \text{ mg mL}^{-1}$  TMR-gelabeltes Aktin verwendet, um die G-zu-F-Transformation zu inhibieren<sup>[172]</sup>. Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR, engl.: *Fourier Transform Infrared*) und Röntgenkleinwinkelstreuexperimente (SAXS, engl.: *Small-Angle X-Ray Scattering*) an G-Aktin wurden in 50 mM Tris-Cl, pH 8.6, 10 mM ATP, 2.4 mM Dithiothreitol (DTT), 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{NaN}_3$  (G-Puffer) durchgeführt. Messungen an F-Aktin wurden in 50 mM Tris-Cl, 10 mM Imidazol, pH 7.8, 10.6 mM ATP, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM KCl, 2.4 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$  durchgeführt. Aktinbündel (B-Aktin) wurden durch Zugabe von 50 mM  $\text{MgCl}_2$  zu F-Aktin-Lösungen hergestellt.<sup>[173]</sup> Für kalorimetrische Messungen wurde ungelabeltes  $\alpha$ -Aktin in 2 mM Tris-Cl, pH 8.2, 0.4 mM ATP, 0.08 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$  verwendet. Kalorimetrische (DSC, PPC) und mikroskopische (TEM, CLSM) Messungen an F- und B-Aktin wurden in identischen Pufferbedingungen durchgeführt, die auch in den FTIR-Experimenten benutzt wurden. Aufgrund der hohen Affinität zu Aktinfilamenten wurde zur Visualisierung von B-Aktin in den durchgeführten CLSM-Experimenten der Fluorophor Phalloidin-Tetramethylrhodamine B Isothiocyanat (Sigma- Aldrich, Seelze, Deutschland) verwendet, der nach der Hitze- oder Druckapplikation zugesetzt wurde.

---

Teile dieser Studie wurden in folgender Referenz veröffentlicht:

Rosin, C., M. Erlkamp, J. von der Ecken, S. Raunser, and R. Winter. **2014**. Exploring the Stability Limits of Actin and its Suprastructures. *Biophys. J.* 107(12): 2973-2983.<sup>[171]</sup>

## Temperatur- und druckabhängige FTIR-Spektroskopie

Zur Durchführung von temperaturabhängigen FTIR-Experimenten wurde ein Nicolet 5700-FTIR-Spektrometer der Firma Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet. Dieses Gerät ist mit einem MCT-Detektor (HgCdTe, Quecksilber-Cadmium-Tellur) ausgestattet, der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird und Spektren in einem Wellenzahlenbereich von 4000 - 1100  $\text{cm}^{-1}$  mit einer spektralen Auflösung von 1  $\text{cm}^{-1}$  aufnimmt. Ein Probenvolumen von  $\sim 20 \mu\text{L}$  wurde zwischen zwei runden Calciumfluorid ( $\text{CaF}_2$ )-Fenstern (Maße: 25 x 4 mm, Pike Technologies, Madison, WI, USA), die durch einen Dichtungsring aus Mylar-Folie ( $h$ : 50  $\mu\text{m}$ ,  $\varnothing_{\text{innen}} = 10.5 \text{ mm}$ , effektives Probenvolumen = 3.9  $\mu\text{L}$ ) getrennt sind, appliziert und in eine temperierbare Vorrichtung eingesetzt. Die Temperatur der somit assemblierten Messzelle wurde vor jeder Messung für die Dauer von 12 min äquilibriert.

Druckabhängige Studien wurden an einem MAGNA 550 FTIR-Spektrometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), ausgestattet mit einem Stickstoff-gekühlten MCT-Detektor (HgCdTe, Quecksilber-Cadmium-Tellur), in einem Wellenzahlenbereich von 4000 - 650  $\text{cm}^{-1}$  mit einer Auflösung von 1  $\text{cm}^{-1}$ , durchgeführt. Um Proben einem Druck von bis zu  $\sim 16 \text{ kbar}$  auszusetzen, wurde eine membrangetriebene Diamantstempelzelle (Diacell<sup>®</sup> VivoDAC) der Firma Almax easyLab (Diskmuide, Belgien) verwendet. Zum kontrollierten Druckaufbau wurde ein automatisierter, pneumatischer Druckregler der Firma GE verwendet (PACE 5000; vertrieben durch Almax easyLab: iGM Controller). Als Abstandshalter und Probenraum diente ein Dichtungsring aus Messing ( $\varnothing_{\text{außen}} = 4 \text{ mm}$ ,  $h = 50 \mu\text{m}$ ) mit einer zentrierten Bohrung ( $\varnothing_{\text{innen}} = 0.5 \text{ mm}$ ), wodurch sich ein Probenvolumen von  $\sim 10 \text{ nL}$  ergibt. Dieser Dichtungsring wurde auf einem 730  $\mu\text{m}$  starken Diamantfenster (Diamant-Typ IIa, Almax easyLab) platziert und 3  $\mu\text{L}$  Probe auf die Bohrung aufgebracht. Als interner Druckindikator wurde die druckabhängige Bandenverschiebung der  $\text{SO}_4^{2-}$ -Streckschwingung von Bariumsulfat ( $\text{BaSO}_4$ ) mit einer Absorptionsbande bei  $\sim 983 \text{ cm}^{-1}$  (bei 1 bar) verwendet.<sup>[145]</sup>

Sowohl in temperatur- als auch in druckabhängigen FTIR-Experimenten wurde eine Proteinkonzentration von 25  $\text{mg mL}^{-1}$  verwendet. Die Temperatur der jeweiligen Messzelle wurde mittels eines Digitalthermometers gemessen und mit einem externen Thermostat (F32-HL) der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) mit einer Genauigkeit

von  $\pm 0.2^\circ\text{C}$ ) reguliert (regulierbarer Temperaturbereich: 1 - 98  $^\circ\text{C}$ ). Zur Optimierung des Signal / Rausch-Verhältnisses wurde der Probenraum kontinuierlich mit trockener Luft (Adsorptionstrockner Typ 15, Zander, Essen, Deutschland) gespült. Für jede Temperatur oder jeden Druck wurden 256 Spektren in Folge aufgenommen, gemittelt und mit einer HAPP-GENZEL-Funktion apodisiert. Die Spektrenaufnahme erfolgte mit dem Softwarepaket OMNIC 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die erhaltenen Spektren wurden mittels der Software GRAM / AI 9.1 wie folgt prozessiert und analysiert: Nach der Subtraktion des Pufferspektrums wurden die Spektren geglättet und im Bereich der Amid-I'-Bande ( $1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$ ) flächennormiert. Die FOURIER-Selbstentfaltung (engl.: *Fourier Self-Deconvolution*, FSD), Bildung von 2. Ableitung und Differenzspektren ermöglichen die Identifikation von Subbanden der Amid-I'-Bande und somit der Detektion von Konformationsänderungen des Proteins. Die Analysen der jeweiligen Amid I'-Bande von G-, F- und B-Aktin ergaben, dass acht Subbanden zugrunde liegen. Nach dem Superpositionsprinzip wurde an die jeweilige Amid-I'-Bande eine Linearkombination von acht VOIGT-Funktionen angepasst, die die Absorptionsbeiträge verschiedener Sekundärstrukturelemente des Proteins widerspiegeln.

**Tabelle 3.1:** Sekundärstrukturelemente und deren Absorptionsbanden im spektralen Bereich der Amid-I'-Bande<sup>[174]</sup>

Sekundärstrukturelement	Absorptionsregion / $\text{cm}^{-1}$
Seitenketten	< 1615
Intermolekulare $\beta$ -Faltblätter	~1615, ~1684
Intramolekulare $\beta$ -Faltblätter	~1627, ~1635
Ungeordnete Strukturen	~1645
$\alpha$ -Helices	~1655
Schleifen	~1660 - ~1670

Unter der Annahme eines Zwei-Zustands-Modells für den Proteinentfaltungs- oder Dissoziationsprozess kann eine BOLTZMANN-Funktion verwendet werden, um jeweils die temperatur- (Gleichung 3.1) oder druckabhängigen (Gleichung 3.2) sigmoidalen Entwicklungen der Sekundärstrukturelementpopulationen mathematisch zu beschreiben:

$$I = \frac{I_f - I_u}{1 + e^{-(1/T_m - 1/T)(\Delta H_{u,vH}^0/R)}} + I_u \quad (3.1)$$

$$I = \frac{I_f - I_u}{1 + e^{-(p-p_m)(\Delta V_u/RT)}} + I_u \quad (3.2)$$

Der native oder entfaltete / dissoziierte Zustand des Proteins wird durch die jeweiligen Plateauwerte der Bandenintensitäten  $I_f$  oder  $I_u$  beschrieben. Die Übergangstemperatur  $T_m$  und -druck  $p_u$  werden durch den Wendepunkt der jeweiligen Funktion wiedergegeben. Die thermodynamischen Parameter  $\Delta H_{u,vH}^0$  und  $\Delta V_u$  sind die Änderungen der Standardreaktionsenthalpie (VAN'T HOFF Enthalpie) und die Volumenänderung der Entfaltungsreaktion. Zur Analyse thermisch-induzierter Veränderungen der Sekundärstruktur von Proteinen wurde Gleichung 3.1 mittels einer globalen Funktionsanpassung an die sigmoidalen Kurvenverläufe der folgenden Sekundärstrukturelemente angepasst:  $\alpha$ -Helices ( $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ ), intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$ ) und intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $\sim 1616 \text{ cm}^{-1}$ ). Druckabhängige Veränderungen der folgenden Sekundärstrukturanteile wurden analog unter Anwendung von Gleichung 3.2 ausgewertet:  $\alpha$ -Helices ( $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ ), intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $\sim 1635$  und  $1627 \text{ cm}^{-1}$ ). Sowohl in temperatur- als auch in druckabhängigen FTIR-Experimenten wurden ausschließlich die genannten Sekundärstrukturelemente zur Analyse verwendet, da diese im Vergleich zu den weiteren Sekundärstrukturanteilen, die zur Funktionsanpassung an die Amid-I'-Bande verwendet wurden, eine hohe Temperatur- und Drucksensitivität aufwiesen.

### Dynamische Differenzkalorimetrie und Druck-Perturbations-Kalorimetrie

Sowohl dynamische Differenzkalorimetrie (engl.: *differential scanning calorimetry*, DSC) als auch Druck-Perturbations-Kalorimetrie (engl.: *pressure perturbation calorimetry*, PPC) wurden mit einem VP-DSC-System der Firma MicroCal (Northampton, MA, USA) durchgeführt, das mit entsprechendem Zubehör für die Drucksprungtechnik ausgestattet ist. Das Volumen der Proben- und Referenzzelle dieses Systems beträgt  $\sim 0.5 \text{ mL}$ . Die Probenzelle wird mit der zu untersuchenden Proteinlösung und die Referenzzelle mit der entsprechenden Pufferlösung befüllt. Für DSC-Messungen wurde eine Proteinlösung mit einer Konzentration von  $1.2 \text{ mg mL}^{-1}$  mit einer Heizrate von  $30 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$  in einem Temperaturbereich von  $20 - 90 \text{ }^\circ\text{C}$  gemessen. Zur Auswertung wurden die Thermogramme im Bereich des Übergangs um die Basislinie korrigiert. Mittels

FOURIER-Selbstentfaltung der erhaltenen Thermogramme wurden Subbanden identifiziert. Anschließend wurde der Peak mit einer entsprechenden Anzahl an GAUSS-Funktionen gefittet. PPC-Experimente wurden mit Proteinlösungen einer Konzentration von  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  in einem Temperaturbereich von  $5\text{--}90^\circ\text{C}$  durchgeführt. Zur Applikation von Drucksprüngen mit einem Druck von 5 bar wurde als Druckmedium Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) verwendet. Für jede Probe wurde ein Satz von Referenzmessungen von entsprechendem Puffer vs. Puffer, Puffer vs. Wasser und Wasser vs. Wasser durchgeführt. Zur Auswertung der kalorimetrischen Datensätze wurde die Software MicroCal Origin 7 verwendet. Die Analyse der DSC-Daten liefert die temperaturabhängigen Änderungen der Wärmekapazität  $\Delta C_{\text{p,u}}^0$ , die Enthalpieänderungen  $\Delta H_{\text{u,cal}}^0$  und die Übergangstemperatur,  $T_{\text{m}}$  des Entfaltungs-/Dissoziationsprozesses von Aktin und Aktinstrukturen.

$$\frac{\Delta V_{\text{u}}}{V} = \int_{T_1}^{T_2} \alpha(T) dT \quad (3.3)$$

Durch PPC-Experimente kann die Temperaturabhängigkeit des thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha(T)$  ermittelt werden, wobei die Integration des Peaks über den entsprechenden Temperaturbereich  $T_1$  bis  $T_2$  des Übergangs die relative Volumenänderung  $\Delta V_{\text{u}}/V$  ergibt (Gleichung 3.3).

### Transmissionselektronenmikroskopie

Ein Volumen von  $4 \mu\text{L}$  frisch präpariertem F- oder B-Aktin werden auf ein zuvor glimmentladenes, kohlenstoffbeschichtetes Kupfer-Netz adsorbiert, bevor zur Negativfärbung  $0.75\%$  Uranylmethanoat ( $\text{UO}_2(\text{CHO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) verwendet wurde (für detaillierte Informationen siehe Referenz<sup>[175]</sup>). Präparierte Proben wurden mit einem JEOL JEM-1400 Transmissionselektronenmikroskop (Peabody, MA, USA), ausgestattet mit einer  $\text{LaB}_6$ -Kathode, bei einer Beschleunigungsspannung von  $120 \text{ kV}$  gemessen. Die Visualisierung erfolgte mittels einer TVIPS TemCam-F416 CMOS Digitalkamera. Die Druckapplikation der Proben bis zu einem Maximaldruck von  $5 \text{ kbar}$  erfolgte mit einem Hochdruckautoklaven, der aus einer Nickelbasislegierung (Allvac 718) in der universitätseigenen mechanischen Werkstatt angefertigt wurde. Als Probenbehälter wurde ein Teflonzylinder mit einer Bohrung ( $\varnothing_{\text{innen}} = 2 \text{ mm}$ ,  $h = 10 \text{ mm}$ ,  $V = 31 \mu\text{L}$ ) zur Befüllung

der Probe angefertigt. Die Probenlösung wurde mit einer Polymerfolie (Versiegelungsfolie, DuraSeal™, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) vom verwendeten Druckmedium (Wasser) getrennt. Eine F-Aktin-Lösung mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  in 50 mM Tris-Cl, 10 mM Imidazol, pH 7.8, 10.6 mM ATP, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM KCl, 2.4 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$  wurde druck- oder temperaturbehandelt. B-Aktin wurde aus Lösungen an F-Aktin ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) hergestellt, indem 50 mM  $\text{MgCl}_2$  hinzugegeben wurden und ebenfalls vor den TEM-Messungen druck- oder temperaturbehandelt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurden die Proben auf Eis gelagert. Für die direkt im Anschluss erfolgten TEM-Messungen wurde die Proteinkonzentration empirisch angepasst, wobei zur Verdünnung der entsprechende Puffer verwendet wurde.

### Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Zur konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (engl.: *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) wurden die Proben, wie bereits beschrieben (Kapitel 3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie), druck- oder temperaturbehandelt und anschließend mittels Phalloidin angefärbt. Die Messungen erfolgten mittels eines invertierten Nikon Eclipse TE300 Mikroskops (Melville, NY, USA). Als Detektor diente ein Bio-Rad MRC-1024 (Hercules, CA, USA). Die Proben wurden mittels eines Krypton-Argon-Lasers bei einer Wellenlänge von 568 nm angeregt und das Laserlicht mittels eines Wasser-Immersionsobjektivs (Nikon Plan Apo 60 $\times$ /1.2) in die Probe fokussiert.

### Röntgenkleinwinkelstreuung

Röntgenkleinwinkelstreu-Experimente (engl.: *Small-Angle X-Ray Scattering*, SAXS) wurden an einem SAXSess mc<sup>2</sup> Messgerät der Firma Anton Paar (Graz, Österreich) durchgeführt. Der Röntgenstrahl wird mit einem Bragg-Gitter monochromatisiert ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ). Die Proben werden in einer 1-mm-Quarzkapillare vermessen, die sich in einer temperierbaren Vorrichtung befindet. Die Streustrahlung wurde mit einer Bildplatte (engl.: *image plate*) detektiert und zur Messung eines Streubildes betrug die Messdauer 30 min. Die erhaltenen Daten wurden mit dem PCG Softwarepaket der Firma Anton Paar prozessiert und analysiert.

### Bestimmung von Taschen und Hohlräumen innerhalb von Proteinen

Taschen und Hohlräume innerhalb von Proteinen wurden mittels des Softwarepakets CASTp-Server ermittelt.<sup>[176]</sup> Proteintaschen werden definiert als konkave Kavitäten, die an der Proteinoberfläche eine Verengung aufweisen und für Wassermoleküle zugänglich sind. Proteinhohlräume hingegen werden definiert als verborgene leere Räume im Proteininneren, die für Wassermoleküle nicht zugänglich sind. Proteintaschen und -hohlräume werden mit einer Kugel mit einem Durchmesser von 1.4 Å, entsprechend dem Radius eines Wassermoleküls, bestimmt. Für eine detaillierte Beschreibung der Bestimmung von Proteintaschen und -hohlräumen seien an dieser Stelle folgenden Referenzen erwähnt:<sup>[177,178]</sup>. Der Beitrag der Proteintaschen und -hohlräume zum Gesamtvolumen des Proteins wurde unter Verwendung der molaren Volumina von 32200 mL mol<sup>-1</sup> für G-Aktin und 31480 mL mol<sup>-1</sup> für F-Aktin berechnet.<sup>[179]</sup> Alle Berechnungen basierten auf den PDB-Strukturen 1NWK<sup>[49]</sup> (G-Aktin) und 3G37<sup>[78]</sup> (F-Aktin). Zur Visualisierung von PDB-Strukturen wurde die Software „The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.“ verwendet.<sup>[44]</sup>

### 3.2.2 Temperatur- und Druckeffekte auf monomeres, filamentöses und gebündeltes Aktin

Um Informationen über die temperatur- und druckabhängigen Veränderungen der Proteinstrukturen und das Phasenverhalten von G-Aktin, F-Aktin und B-Aktin zu erhalten, wurden folgende Analysemethoden in einem großen Temperatur- (5-90 °C) und Druckbereich (1 - 15 kbar) eingesetzt: Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie), Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC), Druck-Perturbations-Kalorimetrie (PPC), Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS), Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Die Analysen der FTIR-spektroskopischen Daten liefern Informationen über Änderungen der Sekundärstruktur von Proteinen und ebenso können damit einhergehende thermodynamische Parameter wie Änderungen der Enthalpie, Entropie und des Volumens, die durch den Entfaltungs- / Dissoziationsprozess resultieren, berechnet werden. Die eingesetzten kalorimetrische Methoden (DSC und PPC) liefern zusätzliche thermodynamische

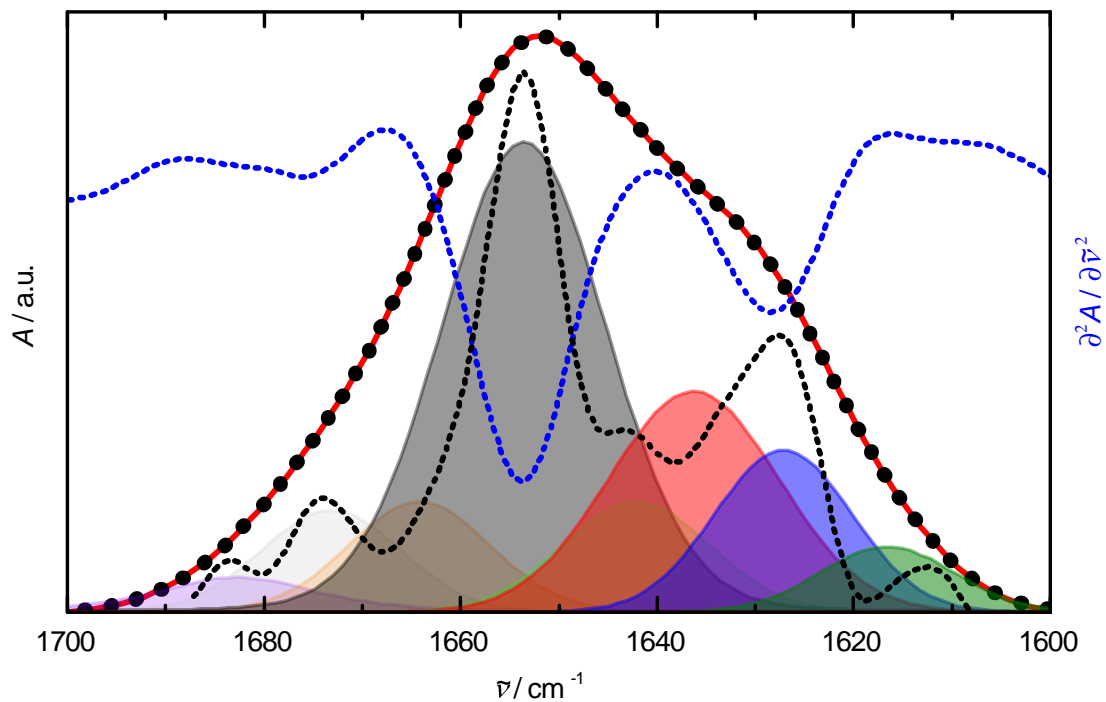
Informationen sowie Hydratations- und Volumenänderungen von Proteinen, die während Entfaltungs- oder Dissoziationsprozessen auftreten können. Zur Visualisierung von temperatur- und druckinduzierten morphologischen Veränderungen von Proteinstrukturen wurden die beiden bildgebenden Verfahren CLSM und TEM eingesetzt.

### **Temperatur- und Druckeffekte auf G-Aktin**

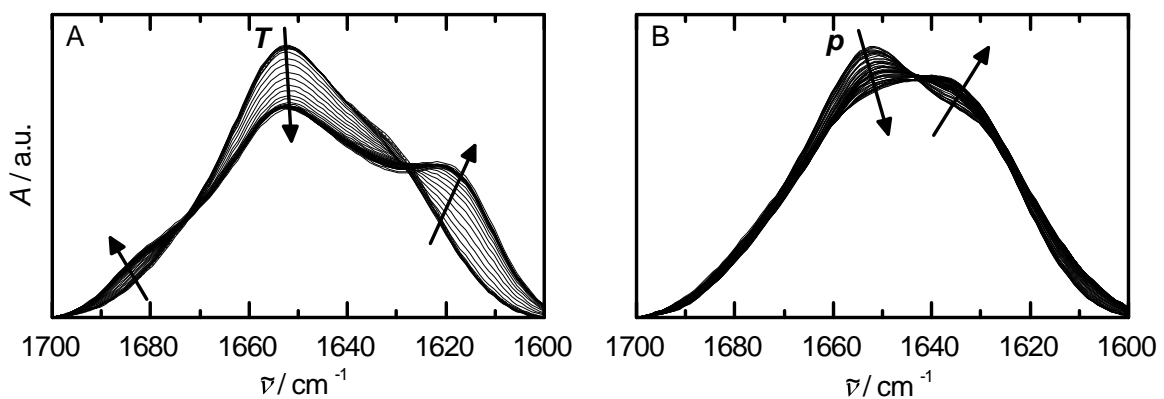
Bevor temperatur- und druckabhängige Veränderungen der Amid-I'-Bande von Aktin studiert werden können, wird diese hinsichtlich ihrer Zusammensetzung an Subbanden analysiert, um Informationen über die Sekundärstrukturanteile des Proteins im nativen Zustand zu erhalten. Abbildung 3.1 zeigt die Amid-I'-Bande von monomerem Aktin bei 20 °C und Atmosphärendruck. Zum einen kann aufgrund der auftretenden Maxima der entfalteten Amid-I'-Bande eine Zuordnung von Subbanden erfolgen und zum anderen auf Basis auftretender Minima in der 2. Ableitung der Amid-I'-Bande. Die somit ermittelten Subbanden, die in Superposition an die experimentell ermittelte Amid-I'-Bande angepasst werden, sind ebenfalls in Abbildung 3.1 eingezeichnet. Des Weiteren wurden Banden berücksichtigt, die z.B. erst bei höheren Temperaturen oder Drücken auftreten oder zur Optimierung der Qualität der Funktionsanpassung notwendig sind, bei der Fitprozedur aber konstant gehalten wurden. Hierbei handelt es sich um intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter mit einem Absorptionsmaximum der Subbande bei  $\sim 1635 \text{ cm}^{-1}$ . Die Population dieser  $\beta$ -Faltblatt-Spezies wird bei hohen Drücken stärker akkumuliert. Des Weiteren wird eine Subbande bei  $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$  benötigt, um zum einen die Qualität der Funktionsanpassung zu gewährleisten und zum anderen ist es aus physikalisch-chemischer Betrachtung sinnvoll, da es sich hierbei um ungeordnete Strukturen der Polypeptidkette handelt, wie sie in den meisten Proteinen enthalten sind.

Die Einwirkungen von steigender Temperatur (A) bei Atmosphärendruck und steigendem Druck (B) bei einer Temperatur von 20 °C auf die Amid-I'-Bande von G-Aktin sind in Abbildung 3.2 exemplarisch dargestellt. Die unterschiedliche Beeinflussung der beiden Parameter ist bereits gut erkennbar und soll im Folgenden genauer analysiert werden. Abbildung 3.3 zeigt temperatur- (F) und druckabhängige (C) Änderungen des FSD-Spektrums der Amid-I'-Bande von G-Aktin und ebenfalls sind prozentua-

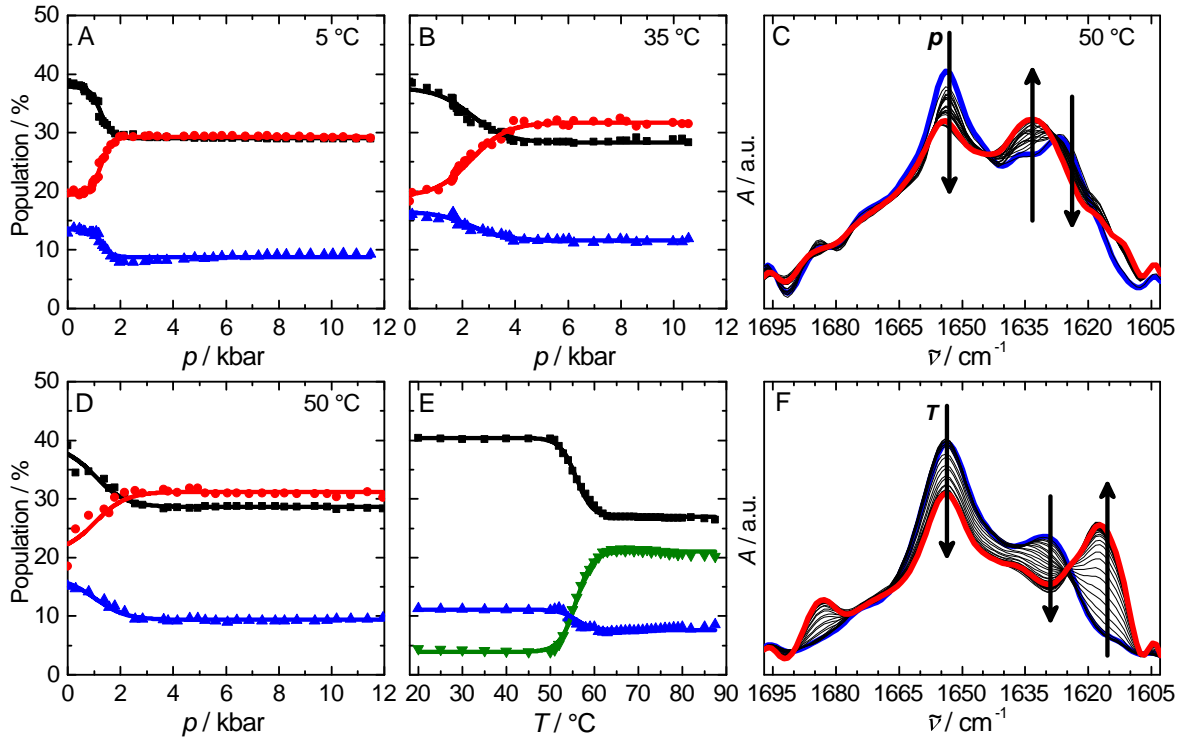




**Abbildung 3.1:** Amid-I'-Bande von G-Aktin (●) bei 20 °C und Atmosphärendruck. Zur Ermittlung von Subbanden wurde das FSD-Spektrum (schwarz gestrichelte Linie) und die 2. Ableitung gebildet (blau gestrichelte Linie). Die zur Funktionsanpassung (rote Linie) verwendeten Subbanden sind ebenfalls eingezeichnet.



**Abbildung 3.2:** Effekt von Temperatur (A) und Druck (B) auf die Amid-I'-Bande von G-Aktin. Teilabbildung (A) zeigt die auftretenden Veränderungen der Amid-I'-Bande in einem Temperaturintervall zwischen 20 und 90 °C bei Atmosphärendruck. In Teilabbildung (B) sind die druckabhängigen Effekte in einem Bereich von 1 bar bis ~10 kbar bei einer Temperatur von 20 °C dargestellt. Pfeile zeigen in Richtung steigender Temperatur bzw. steigendem Druck.

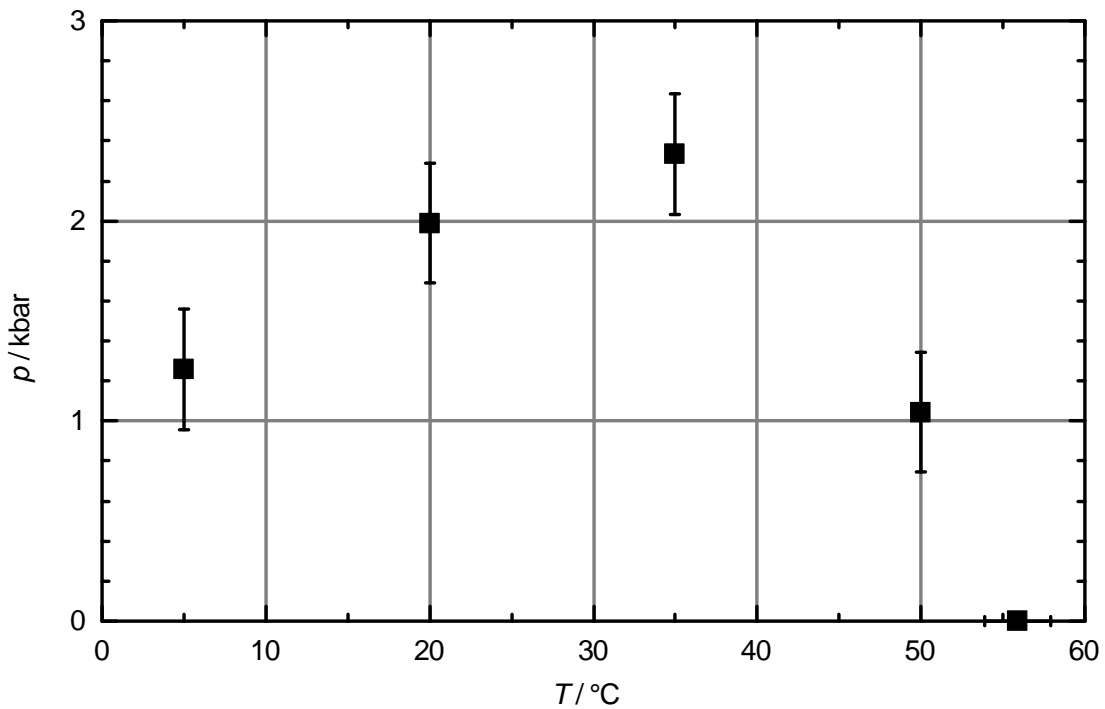


**Abbildung 3.3:** Temperatur- und druckabhängige FTIR-spektroskopische Analysen von G-Aktin. Änderungen ausgewählter Sekundärstrukturelemente bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit des Drucks (A, B, D) und temperaturabhängige Änderungen bei Atmosphärendruck (E). An die erhaltenen Daten wurden die Boltzmannfunktionen 3.1 und 3.2 angepasst (als jeweilige Linie dargestellt). Druck- (C) und temperaturabhängige (F) Änderungen des Absorptionssignals des FSD-Spektrums von G-Aktin. ■  $\alpha$ -Helix ( $1655\text{ cm}^{-1}$ ), ● intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1635\text{ cm}^{-1}$ ), ▲ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1627\text{ cm}^{-1}$ ), ▼ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1616\text{ cm}^{-1}$ ).

le Änderungen ausgewählter Sekundärstrukturelemente als Funktion der Temperatur (E) und des Drucks (A, B, D) dargestellt. In beiden Fällen, steigender Temperatur und steigendem Druck, werden maßgeblich die selben Sekundärstrukturelemente des Proteins beeinflusst:  $\alpha$ -Helices (Absorptionsmaximum bei  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ ), intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (Absorptionsmaxima bei  $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1627\text{ cm}^{-1}$ ) und intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (Absorptionsmaxima bzw. Aggregationsbanden bei  $\sim 1616\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1685\text{ cm}^{-1}$ ); (vgl. Tabelle 3.1).

Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, dass die Kristallstruktur von monomerem Aktin ( $\alpha$ -Aktin isoliert aus Kaninchenmuskel) mit gebundenem ATP einen helikalen Anteil von 41 % und 20 %  $\beta$ -Faltblätter aufweist.<sup>[172]</sup> Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weisen einen sehr ähnlichen Anteil an  $\alpha$ -Helices von  $\sim 40\%$  auf. Der Anteil an  $\beta$ -Faltblättern hingegen fällt im Vergleich zur Kristallstruktur etwas höher aus ( $\sim 30\%$ ),

was vermutlich auf etwas unterschiedliche Absorptionskoeffizienten der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zurückzuführen ist. Da in den folgenden Studien ausschließlich relative Änderungen der jeweiligen Sekundärstrukturelemente betrachtet werden, wird dem keine besondere Bedeutung beigemessen. Aus Abbildung 3.3 wird ersichtlich, dass eine Erhöhung der Temperatur oder des Drucks in der Messzelle eine signifikante Verringerung an helikalen Strukturen und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$ ) innerhalb des Proteins zur Folge hat. Hingegen weisen Temperatur und Druck bzgl. der Spezies an  $\beta$ -Faltblätter, absorbierend bei  $\sim 1635 \text{ cm}^{-1}$ , einen unterschiedlichen Effekt auf. Die durchgeführten, temperaturabhängigen Studien zeigen, dass zwischen 20 und  $50^\circ\text{C}$  keine signifikanten Veränderungen der nativen Struktur des Proteins auftreten (Abb. 3.3 E). Die thermische Entfaltung von G-Aktin beginnt ab einer Temperatur von  $\approx 50^\circ\text{C}$  und wird durch eine Verringerung von  $\alpha$ -Helices ( $\sim 14\%$ ) und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 4\%$ ) begleitet. Weiterhin werden im Temperaturintervall von  $\sim 50$ - $63^\circ\text{C}$  antiparallele intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter gebildet, die bei Wellenzahlen von  $\sim 1685 \text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1616 \text{ cm}^{-1}$  ein Absorptionsmaximum aufweisen. Diese IR-Signaturen sind charakteristisch für eine thermisch induzierte auftretende Proteinaggregation. Die globale Funktionsanpassung unter Verwendung von Gleichung 3.1 an die experimentellen Daten (Abb. 3.3 E) liefert eine Entfaltungstemperatur,  $T_m$ , von  $56 \pm 2^\circ\text{C}$  und eine Änderung der VAN'T HOFF Enthalpie  $\Delta H_{u,vH}^0$  von  $483 \pm 101 \text{ kJ mol}^{-1}$  für den thermisch induzierten Entfaltungsprozess von G-Aktin. Aufgrund der Tatsache, dass die thermische Entfaltung von G-Aktin, wie bei den meisten Proteinen, irreversibel ist, dienen die erhaltenen thermodynamischen Daten nicht als Absolutwerte, sondern ausschließlich zum Vergleich der verschiedenen Aktinspezies (G-, F- und B-Aktin) untereinander.<sup>[180–182]</sup> Mit ansteigendem Druck erhöht sich der Anteil an intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $1635 \text{ cm}^{-1}$ ) und der prozentuale Anteil an intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter mit einem Absorptionsmaximum bei  $1627 \text{ cm}^{-1}$  (kennzeichnend für  $\beta$ -Faltblätter mit stärkeren Wasserstoffbrückenbindungen) sinkt gleichzeitig ab (Abb. 3.3 A, B, D). Die Analyse der druckabhängigen FTIR-Studien bei Temperaturen zwischen 5 und  $50^\circ\text{C}$  ergeben unter Anwendung von Formel 3.2 Übergangs- bzw. Entfaltungsdrücke  $p_m$  zwischen  $\sim 1$  und  $\sim 2.5 \text{ kbar}$ , wie aus dem somit erstellten  $p$ - $T$ -Phasendiagramm ersichtlich wird (Abb. 3.4). Bei einer konstanten Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  liegt der Entfaltungsdruck



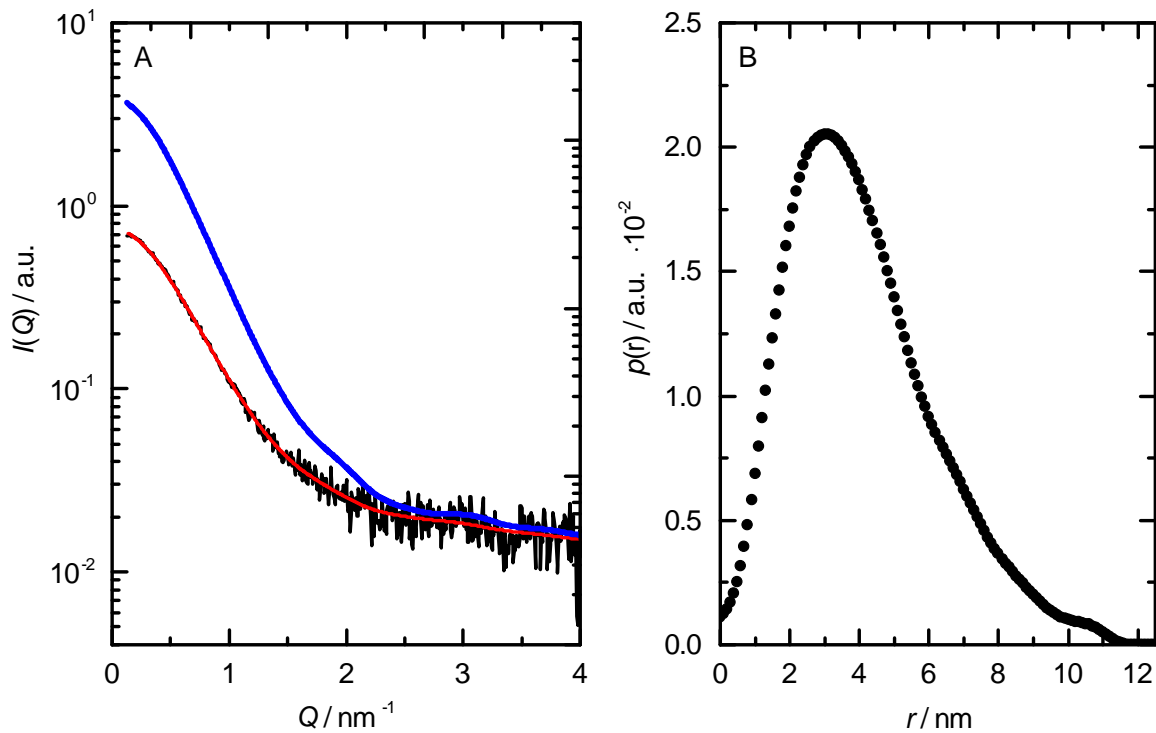
**Abbildung 3.4:**  $p$ - $T$ -Phasendiagramm von G-Aktin.

von G-Aktin bei 1988 bar. Dieser Wert ist im Rahmen des experimentellen Fehlers in sehr guter Übereinstimmung mit einer Studie von Ikeuchi et al.<sup>[158]</sup>, in der, basierend auf fluoreszenzspektroskopischen Methoden, Druckeffekte auf G-Aktin studiert wurden. Unter Anwendung von Gleichung 3.2 kann ebenso die Volumenänderung  $\Delta V_u$  die mit dem druckabhängigen Übergangsprozess des Proteins einhergeht, bestimmt werden. Im Falle von G-Aktin weisen die Volumenänderungen folgenden Werte auf:  $-12 \pm 9 \text{ mL mol}^{-1}$  ( $T = 5 ^\circ\text{C}$ ),  $-16 \pm 6 \text{ mL mol}^{-1}$  ( $T = 20 ^\circ\text{C}$ ),  $-35 \pm 14 \text{ mL mol}^{-1}$  ( $T = 35 ^\circ\text{C}$ ) und  $-45 \pm 13 \text{ mL mol}^{-1}$  ( $T = 50 ^\circ\text{C}$ ), die im Rahmen des experimentellen Fehlers einen ähnlichen Wert aufweisen.

Als Mechanismus für die druckinduzierte Entfaltung von Proteinen wird generell die Freisetzung von Hohlräumen innerhalb des Proteins, elektrostriktive Effekte von durch den Übergangsprozess neu exponierten und polaren hydratisierten Gruppen sowie die Verringerung von hydrophoben Interaktionen diskutiert.<sup>[155]</sup> Da die Polymerisationsreaktion von Aktin ein entropisch begünstigter Prozess ist, deutet dies daraufhin, dass gerade hydrophobe Interaktionen eine kritische Rolle darstellen, die bekannterweise durch Druck verringert werden können und die einzigen nicht-kovalenten Bindungen

darstellen, dessen Ausbildung mit positiven Änderungen der Enthalpie und Entropie verbunden sind.<sup>[159,183]</sup> Das DSC-Thermogramm von G-Aktin weist einen breiten Peak zwischen 48 und 66 °C mit einer Durchschnittsübergangstemperatur von 59.5 °C auf (Abb. 3.6). Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit gegebenen Literaturdaten.<sup>[184,185]</sup> Um etwaige Subbanden zu finden, wurden Fourier-Selbstentfaltungsfunktionen auf den Peak angewendet, wodurch zwei Subprozesse mit Übergangstemperaturen von 56.5 (Peak 1) und 60.3 °C (Peak 2) ermittelt werden konnten; ebenfalls in guter Übereinstimmung mit bisherigen Literaturdaten.<sup>[185]</sup> Die identifizierten Subbanden deuten somit auf einen thermisch induzierten biphasischen Entfaltungsprozess hin. Um die Reversibilität des Entfaltungsprozesses zu prüfen, wurde im direkten Anschluss an die Aufnahme des ersten Thermogramms von selbiger Probe erneut ein Thermogramm aufgenommen (Daten nicht dargestellt), das keinerlei Übergänge mehr aufweist. Somit scheint die thermische Entfaltung von G-Aktin irreversibel zu sein.

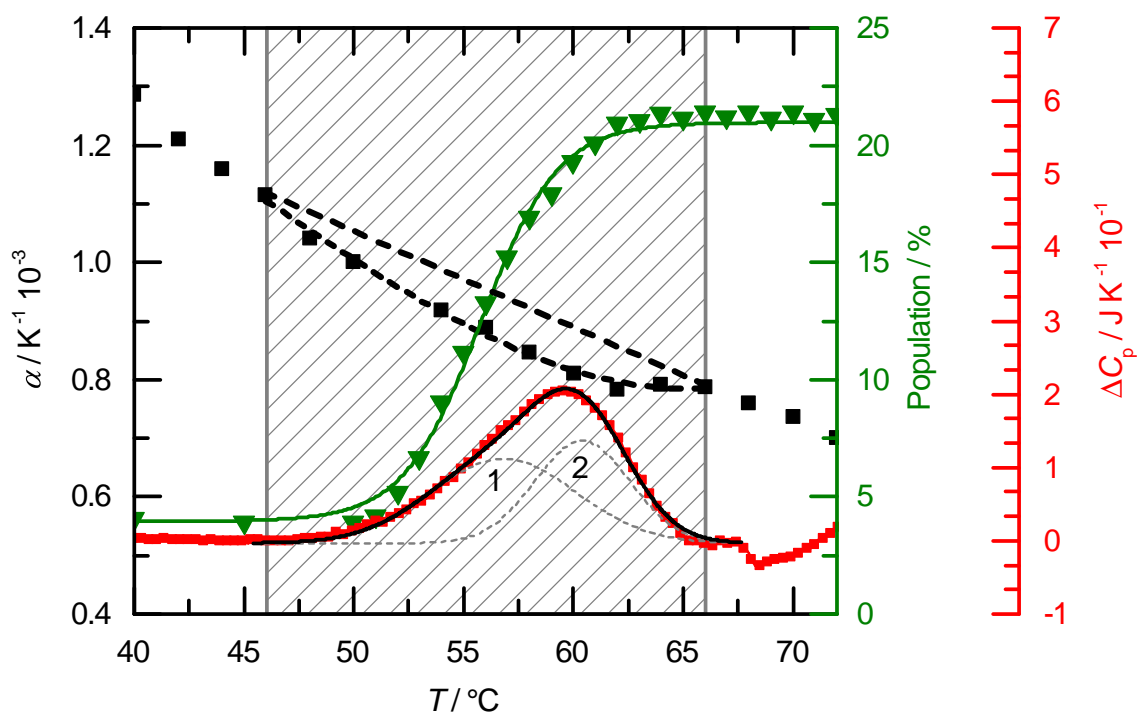
Analysen mittels Röntgendiffraktometrie haben gezeigt, dass G-Aktin aus zwei Hauptdomänen (I und II) besteht, die über eine  $\alpha$ -Helix miteinander verknüpft sind und eine Nukleotidbindungstasche bilden.<sup>[49]</sup> Somit ist der biphasische Entfaltungsprozess vermutlich auf die sequentielle Entfaltung der beiden Hauptdomänen des Proteins, die durch eine Bindungstasche getrennt sind, zurückzuführen, wie bereits von Bertazzon et al. vorgeschlagen.<sup>[186]</sup> Der thermisch induzierte Übergang des nativen Proteinzustandes in den entfalteten Zustand, bzw. die Integration des DSC-Peaks, resultiert in einer Enthalpieänderung für diesen Prozess von  $\Delta H_{u,cal}^0 = 364 \pm 34 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Dieser Wert liegt etwas unterhalb der spektroskopisch bestimmten Enthalpieänderung  $\Delta H_{u,vH}^0$ , basierend auf einem Zwei-Zustands-Modell. Bisherige Studien an G-Aktin mittels Röntgenkleinwinkelstreuung unter ähnlichen Bedingungen haben gezeigt, dass der Gyrationradius von G-Aktin  $\sim 23.7 \text{ \AA}$  beträgt.<sup>[40]</sup> In einer weiteren Studie von Norman et al. wird der Gyrationradius zu  $\sim 27.0 \text{ \AA}$  bestimmt.<sup>[187]</sup> Die erhaltenen Streudaten in dieser Arbeit ergeben einen Gyrationradius  $r_G$  von  $30.8 \text{ \AA}$ . Bei näherer Betrachtung der Abstandsverteilungsfunktion (Abb. 3.5) ist eine leichte Schulter im Bereich um  $\sim 70 \text{ \AA}$  zu erkennen. Der höhere Wert, im Vergleich zu den bereits publizierten Daten, resultiert vermutlich aus vorhandenen Populationen an Aktindi- und trimeren, die größere Gyrationradien aufweisen und somit den Peak zu größeren Werten hin verbreitern. Bei



**Abbildung 3.5:** Röntgenkleinwinkelstreuexperimente an G-Aktin. A) Streukurve (schwarze Linie) von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  G-Aktin bei einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$ . Die Funktionsanpassung ist als rote Linie eingezeichnet. Nach Korrektur des Linienfokus (Entschmierung) und Hintergrundsignals wird die in blau dargestellte Kurve erhalten. B) Abstandsverteilungsfunktion  $p(r)$  von G-Aktin. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Mirko Erkamp durchgeführt.

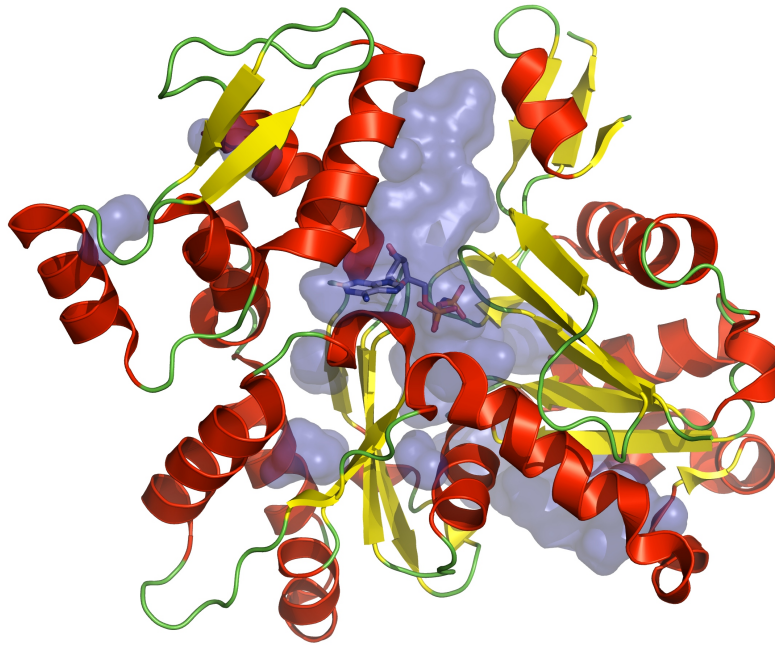
den in dieser Arbeit zu kalorimetrische Messungen eingesetzten relativ hohen Proteinkonzentrationen an G-Aktin könnten somit bereits Populationen an Dimeren und Trimeren entstanden sein.

Abbildung 3.6 zeigt die Temperaturabhängigkeit des thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha(T)$  von G-Aktin. Unter Verwendung eines partiellen spezifischen Volumens  $v_0$  von  $0.749 \text{ mL g}^{-1}$  [188] und einer molekularen Masse von  $42348 \text{ Da}$  für G-Aktin, kann die thermisch induzierte Volumenänderung des Proteins, die mit dem Entfaltungsprozess einhergeht, bestimmt werden. Die Integration von  $\alpha(T)$  über das Temperaturintervall des Übergangs (bestimmt durch die genauere DSC-Messung) liefert eine Volumenänderung  $\Delta V_u$  von  $-36 \pm 20 \text{ mL mol}^{-1}$  für den thermisch induzierten Entfaltungsprozess von G-Aktin. Bezogen auf das Gesamtvolumen des Proteins handelt es sich hierbei um einen Beitrag von  $\sim 0.1\%$ . Die computergestützte Bestimmung von Hohlräumen innerhalb von G-Aktin (basierend auf der PDB-Struktur: 1NWK [49]) mittels der Software CASTp-



**Abbildung 3.6:** Kalorimetrische Analyse von G-Aktin. Das mittels DSC erhaltene Thermogramm wurde mittels zweier GAUSS-Funktionen (grau gestrichelte Linien) angepasst (schwarze Linie). Die erhaltenen PPC-Daten (■) wurden im Bereich des thermischen Übergangs (grau schraffierter Bereich) integriert (schwarz gestrichelte Linien). Ebenfalls ist zum Vergleich die Temperaturabhängigkeit der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $1616\text{ cm}^{-1}$ ) (▼) aus den bereits vorgestellten FTIR-Experimenten eingezeichnet.

Server<sup>[176]</sup> liefert einen Wert von  $24\text{ mL mol}^{-1}$ , der in sehr guter Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten Wert ist und einen prozentualen Anteil von  $\sim 0.0075\%$  am Proteinvolumen ausmacht (Abb. 3.7). Allerdings muss hier erwähnt werden, dass es sich bei experimentell ermittelten apparenten Volumenänderungen, die mit der thermischen Entfaltung einhergehen, ebenfalls um Hydratationsbeiträge handeln kann, da sich die für das Solvens zugängliche Proteinoberfläche verändert.

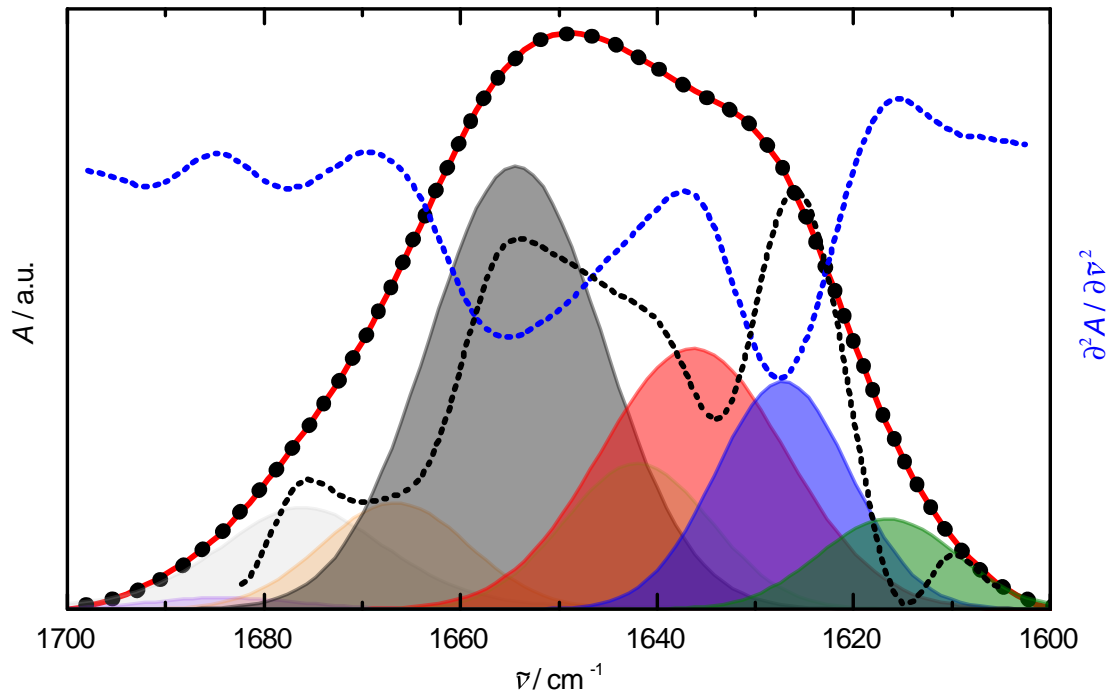


**Abbildung 3.7:** 3D-Bändermodell der Kristallstruktur von G-Aktin mit gebundenem ATP (PDB-Struktur: 1NWK<sup>[49]</sup>). Proteintaschen (konkave Kavitäten, die an der Proteinoberfläche eine Verengung aufweisen und für Wassermoleküle zugänglich sind) und Proteinhohlräume (verborgene leere Räume im Proteininneren, die für Wassermoleküle nicht zugänglich sind) sind in blau dargestellt. Das berechnete Gesamtvolumen von Proteintaschen und -hohlräumen beträgt ~1.1 % des Gesamtvolumens von G-Aktin. Das Volumen der Proteintaschen allein beträgt relativ zum Gesamtvolumen des Proteins ~0.0075 %. Das 3D-Bändermodell wurde mittels „The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.“<sup>[44]</sup> basierend auf der Kristallstruktur 1NWK<sup>[49]</sup> dargestellt.

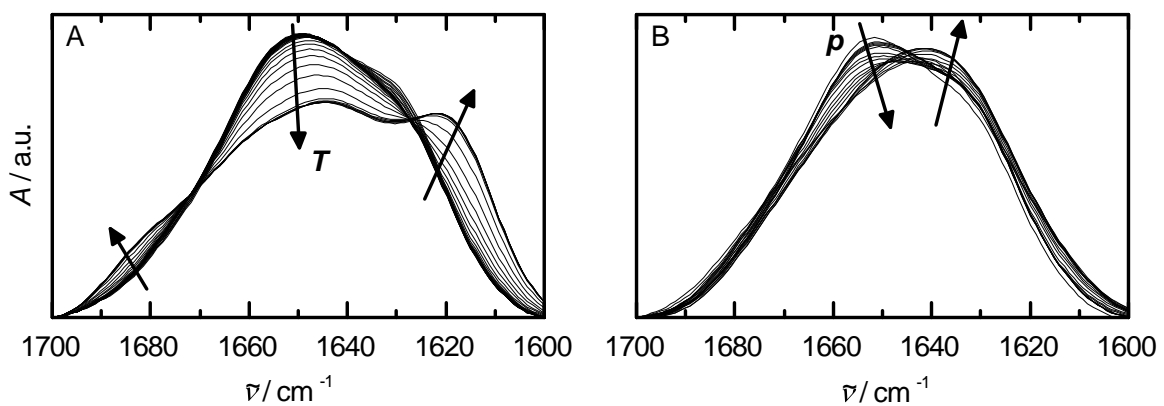
### Temperatur- und Druckeffekte auf F-Aktin

In Abbildung 3.8 ist die Amid-I'-Bande von F-Aktin in nativer Konformation bei 20 °C und Atmosphärendruck dargestellt. Ebenfalls eingezeichnet sind die Subbanden, die im Folgenden zur Analyse von Temperatur- und Druckeffekten dienen. Diese Banden wurden anhand der 2. Ableitung und des FSD-Spektrums der Amid-I'-Bande bestimmt. Die Einwirkungen von steigender Temperatur (A) bei Atmosphärendruck und steigendem Druck (B) bei einer Temperatur von 20 °C auf die Amid-I'-Bande von F-Aktin sind in Abbildung 3.9 exemplarisch dargestellt. Die unterschiedliche Beeinflussung der beiden Parameter ist bereits gut erkennbar und wird im Folgenden genauer analysiert.





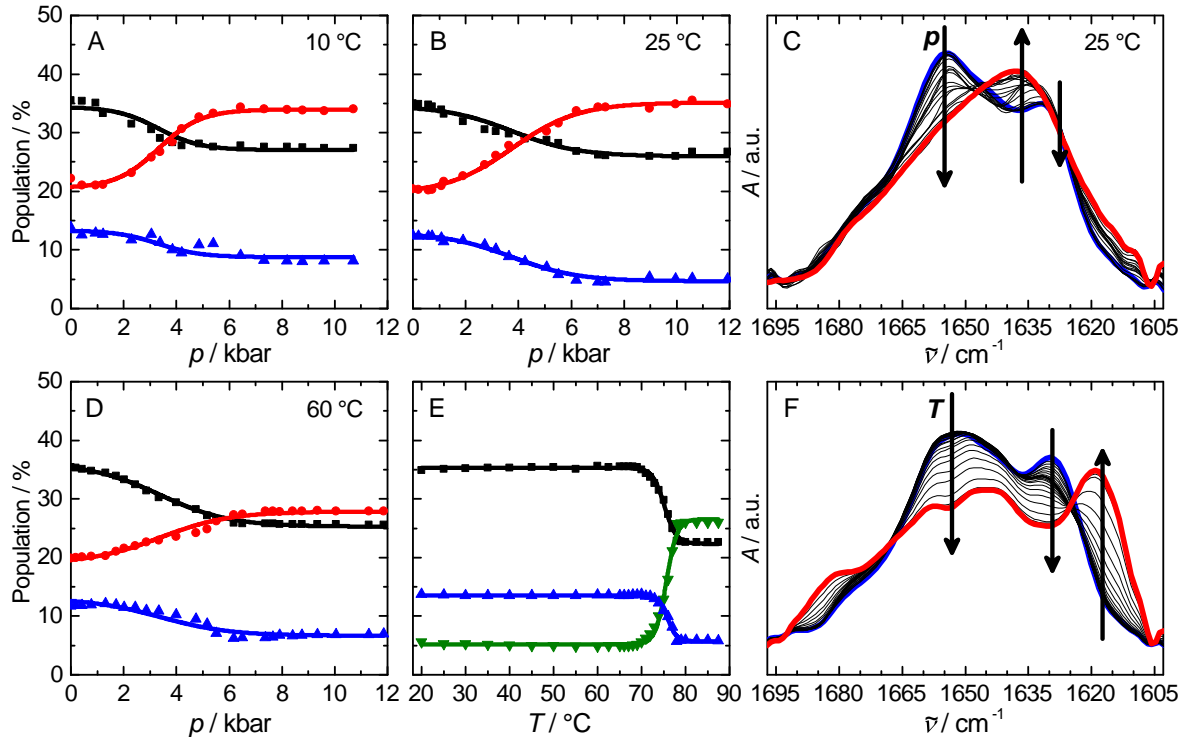
**Abbildung 3.8:** Amid-I'-Bande von F-Aktin (●) bei 20 °C und Atmosphärendruck. Zur Ermittlung von Subbanden wurde die Amid-I'-Bande entfaltet (schwarz gestrichelte Linie) und die 2. Ableitung gebildet (blau gestrichelte Linie). Die zur Funktionsanpassung (rote Linie) verwendeten Subbanden sind ebenfalls eingezeichnet.



**Abbildung 3.9:** Effekt von Temperatur (A) und Druck (B) auf die Amid-I'-Bande von F-Aktin. Teilabbildung (A) zeigt die auftretenden Veränderungen der Amid-I'-Bande in einem Temperaturintervall zwischen 20 und 90 °C bei Atmosphärendruck. In Teilabbildung (B) sind die druckabhängigen Effekte in einem Bereich von 1 bar bis ~10 kbar bei einer Temperatur von 20 °C dargestellt. Pfeile zeigen in Richtung steigender Temperatur bzw. steigendem Druck.

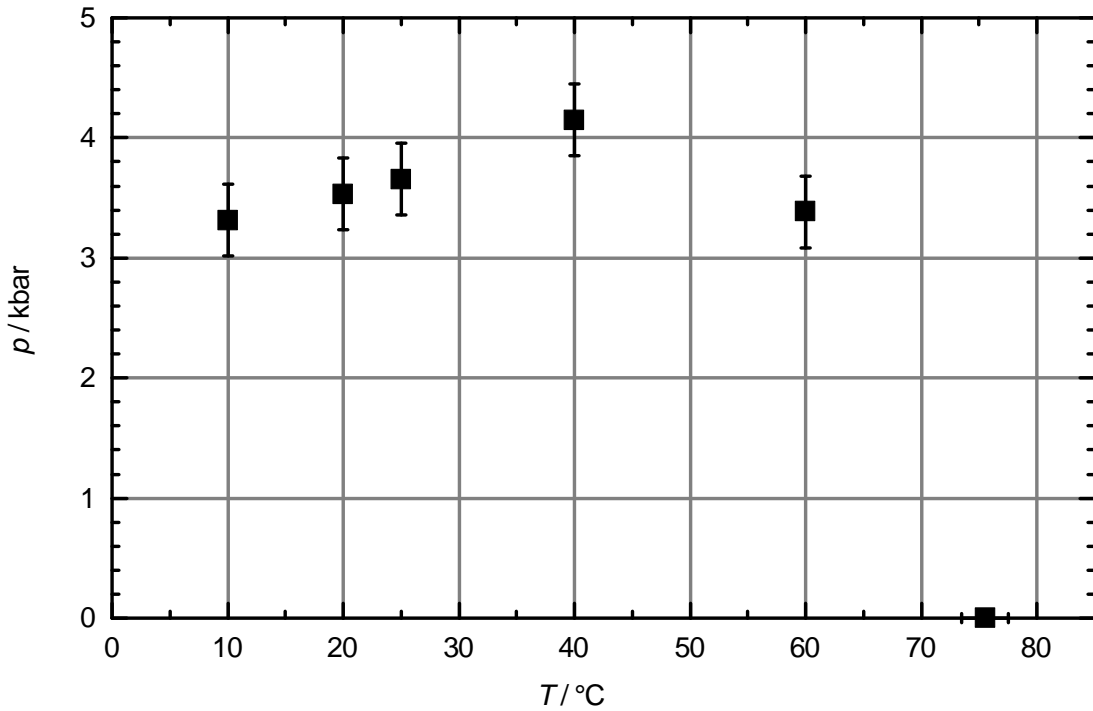
Der native Zustand von Aktinfilamenten weist innerhalb der Amid-I'-Bande des IR-Spektrums zwei Hauptbanden bei Wellenzahlen von  $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha$ -Helices) und  $\sim 1628 \text{ cm}^{-1}$  (intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter) auf (Abb. 3.10 F). Die thermisch denaturierte Struktur des Proteins hingegen zeigt zwei ausgeprägte Banden bei Wellenzahlen von  $\sim 1616 \text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1685 \text{ cm}^{-1}$  (intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter), die charakteristisch für eine erfolgte Proteinaggregation sind. Bis zu einer Temperatur von  $\sim 67^\circ\text{C}$  sind keine signifikanten Änderungen innerhalb der Sekundärstrukturelemente des Proteins detektierbar. Ab einer Temperatur von  $\sim 70^\circ\text{C}$  beginnt der thermische Übergang, der eindeutig durch eine stark sinkende Population an  $\alpha$ -Helices ( $\sim 13\%$ ) und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 8\%$ ) charakterisiert ist. Gleichzeitig steigt der Anteil an intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern drastisch an ( $\sim 23\%$ ). Ab einer Temperatur von  $\sim 79^\circ\text{C}$  liegt das Protein in thermisch denaturierter und aggregierter Form vor und die Veränderungen innerhalb der Protomerstruktur werden ersichtlich. Die mittels Formel 3.1 bestimmte Übergangstemperatur  $T_m$  beträgt  $75.5 \pm 2^\circ\text{C}$  und die Standardreaktionsenthalpie  $\Delta H_{u,vH}^0$  wird zu  $821 \pm 141 \text{ kJ mol}^{-1}$  bestimmt.

Steigender Druck führt zu einer Abnahme der Sekundärstrukturanteile von  $\alpha$ -Helices bei  $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$  und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern bei  $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$ . Der Anteil der Spezies an intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 1635 \text{ cm}^{-1}$ ), charakterisiert durch schwächere Wasserstoffbrückenbindungen, steigt hingegen an. Die druckinduzierte Proteinentfaltung tritt je nach Temperatur ( $10, 20, 25, 40, 60^\circ\text{C}$ ) zwischen 3.3 und 4.1 kbar auf. Aus den gewonnenen temperatur- und druckabhängigen Daten wurde das  $p$ - $T$ -Phasendiagramm von F-Aktin erstellt (Abb. 3.11). Die ermittelten Volumenänderungen  $\Delta V_u$ , die während der druckabhängigen Entfaltung des Proteins auftreten, sind, wie auch bei der monomeren Spezies, sehr klein ( $\mathcal{O}(\Delta V) = \sim 1 \text{ Wassermolekül} = 18 \text{ mL mol}^{-1}$  ( $T = 20^\circ\text{C}$ )) und haben ein negatives Vorzeichen:  $-29.2 \text{ mL mol}^{-1}$  ( $10^\circ\text{C}$ ),  $-21.1 \text{ mL mol}^{-1}$  ( $20^\circ\text{C}$ ),  $-20.1 \text{ mL mol}^{-1}$  ( $25^\circ\text{C}$ ),  $-14.1 \text{ mL mol}^{-1}$  ( $40^\circ\text{C}$ ),  $-21.2 \text{ mL mol}^{-1}$  ( $60^\circ\text{C}$ ). Diese kleinen Volumenänderungen, die bei starker Kompression auftreten, deuten auf eine sehr dichte Packung bzw. sehr kleine Hohlräume des Proteins hin. Sowohl der temperatur- als auch der druckabhängige Entfaltungs- / Dissoziationsprozess von F-Aktin sind mit einer Abnahme von  $\alpha$ -Helices und einer Spezies intramolekularer  $\beta$ -Faltblättern mit stärker ausgeprägten Wasserstoffbrückenbindungen verbunden ( $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$ ). Allerdings



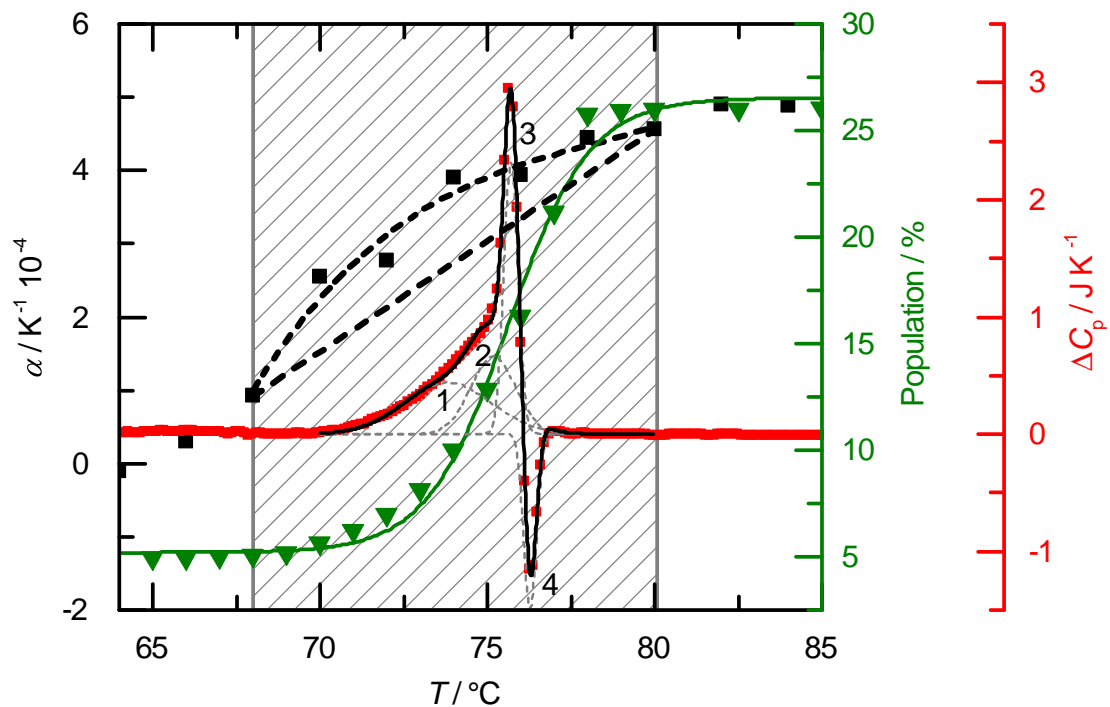
**Abbildung 3.10:** Temperatur- und druckabhängige FTIR-spektroskopische Analysen von F-Aktin. Änderungen ausgewählter Sekundärstrukturelemente bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit des Drucks (A, B, D) und temperaturabhängige Änderungen bei Atmosphärendruck (E). An die erhaltenen Daten wurden die Boltzmannfunktionen 3.1 und 3.2 angepasst (als jeweilige Linie dargestellt). Druck- (C) und temperaturabhängige (F) Änderungen des Absorptionssignals der entfalten Amid-I'-Bande von F-Aktin. ■  $\alpha$ -Helix ( $1655\text{ cm}^{-1}$ ), ● intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1635\text{ cm}^{-1}$ ), ▲ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1627\text{ cm}^{-1}$ ), ▼ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1616\text{ cm}^{-1}$ ).

wird die Spezies intramolekularer  $\beta$ -Faltblätter mit schwächeren Wasserstoffbrückenbindungen ( $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ ) unterschiedlich beeinflusst: Eine Kompression der Probe führt zu einer Akkumulation dieser  $\beta$ -Faltblatt-Spezies. Hohe Temperaturen hingegen scheinen keinen Einfluss auf diese Population zu nehmen. DSC-Analysen von F-Aktin weisen einen Peak zwischen  $69$  und  $78\text{ °C}$  auf und die Integration des Peaks ergibt eine endotherme Enthalpieänderung von  $874 \pm 36\text{ kJ mol}^{-1}$ . Die Analyse des Peaks mittels FSD-Methoden ergibt, dass der Peak des thermischen Übergangs von F-Aktin in mehrere Subbanden zerlegt werden kann (Abb. 3.12). Im Falle der thermischen Denaturierung von F-Aktin handelt sich um einen triphasischen Übergang. Peak 1 ( $73.8\text{ °C}$ ) und Peak 2 ( $75.2\text{ °C}$ ) sind wahrscheinlich auf eine partielle Entfaltung von Monomeren innerhalb der Polymerkette der Filamente zurückzuführen. Diese partielle Entfaltung begrün-



**Abbildung 3.11:**  $p$ - $T$ -Phasendiagramm von F-Aktin.

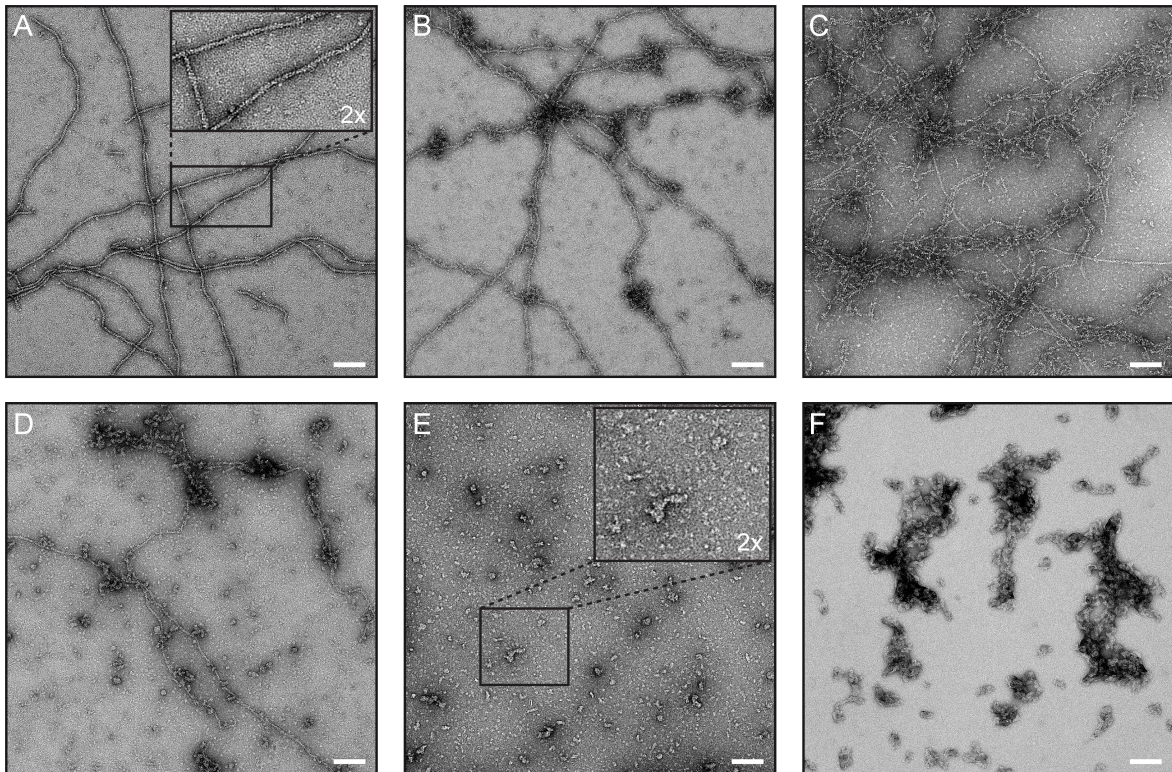
det vermutlich die folgende hochkooperative Dissoziation des Filaments bei  $\sim 75.7^\circ\text{C}$  (Peak 3), die zu dieser sehr scharfen Peakform führt. Der exotherme Peak 4 mit einem Minimum bei einer Temperatur von  $76.3^\circ\text{C}$  ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Aggregation thermisch denaturierter Aktinmonomere zurückzuführen, wie auch bereits durch Levitsky et al. beschrieben wurde.<sup>[189]</sup> Dieses Aggregationsverhalten wird ebenfalls durch die hier vorgestellten FTIR-Daten verifiziert, die einen starken Anstieg an intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter im selben Temperaturintervall aufweisen (Abb. 3.10 und 3.12). Unter Verwendung einer molekularen Masse von  $42348 \text{ g mol}^{-1}$  und einem partiellen spezifischen Volumen  $v_0$  von  $0.632 \text{ mL g}^{-1}$ <sup>[188]</sup> wird die Volumenänderung des thermisch induzierten Übergangs via Integration des thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha(T)$  bestimmt (Abb. 3.12). Die so berechnete Volumenänderung  $\Delta V_u$  beträgt  $26 \text{ mL mol}^{-1}$  bei  $T = T_m$  und Atmosphärendruck. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von  $\sim 0.1\%$  des gesamten Proteinvolumens. Die computergestützte Berechnung von Proteinhohlräumen mittels der frei verfügbaren Software CASTp-Server ergibt, basierend auf der PDB-Struktur 3G37<sup>[78]</sup> von F-Aktin, einen Wert von  $29 \text{ mL mol}^{-1}$ , also einen prozentualen Anteil von  $0.09\%$  am Gesamtproteinvolumen. Dieser Wert ist



**Abbildung 3.12:** Kalorimetrische Analyse von F-Aktin. Das mittels DSC erhaltene Thermogramm wurde mittels vier GAUSS-Funktionen (grau gestrichelte Linien) angepasst (schwarze Linie). Die erhaltenen PPC-Daten (■) wurden im Bereich des thermischen Übergangs (grau schraffierter Bereich) integriert (schwarz gestrichelte Linien). Ebenfalls ist zum Vergleich die Temperaturabhängigkeit der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $1616 \text{ cm}^{-1}$ ) (▼) aus den bereits vorgestellten FTIR-Experimenten eingezeichnet.

in sehr guter Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten Wert.

Zur Visualisierung von Temperatur- und Druckeffekten auf die Morphologie von Aktinfilamenten wurden F-Aktin-Proben präpariert und anschließend Drücken von 1.5 kbar, 3 kbar, 4 kbar und 5 kbar für einen Zeitraum von 20 min ausgesetzt (Abb. 3.13). Um das thermisch induzierte Aggregationsverhalten von Aktinfilamenten zu visualisieren wurden Proben bei einer Temperatur von  $90^\circ\text{C}$  für einen Zeitraum von 20 min inkubiert. Nach der Dekompression/Hitzeinkubation der Proben wurden diese direkt auf Eis gelagert, um eventuelle reversible Reaktionen zu blockieren bzw. auf ein Minimum zu reduzieren. In Abbildung 3.13 A sind präparierte Filamente bei Atmosphärendruck und einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  zu sehen. Die gute Qualität der Proben und Auflösung des Messsystems ist ersichtlich; die helikale Struktur der Filamente ist sehr gut zu erkennen - selbst die kleine und große Furche der Helix werden sichtbar



**Abbildung 3.13:** Mikrofotografien von F-Aktin mittels TEM. F-Aktin-Proben wurden verschiedenen Drücken für einen Zeitraum von 20 min ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben dekomprimiert und mikroskopiert (A-E). TEM-Aufnahmen von F-Aktin bei Atmosphärendruck (A) und nach Druckapplikation von 1.5 kbar (B), 3 kbar (C), 4 kbar (D) und 5 kbar (E). Zur Visualisierung der thermisch induzierten Aggregation des Proteins wurde die Probe bei einer Temperatur von 90 °C für einen Zeitraum von 20 min inkubiert (F). Maßstabsskala: 100 nm. Die TEM-Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit von Julian von der Ecken (MPI Dortmund, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Stefan Raunser) durchgeführt.

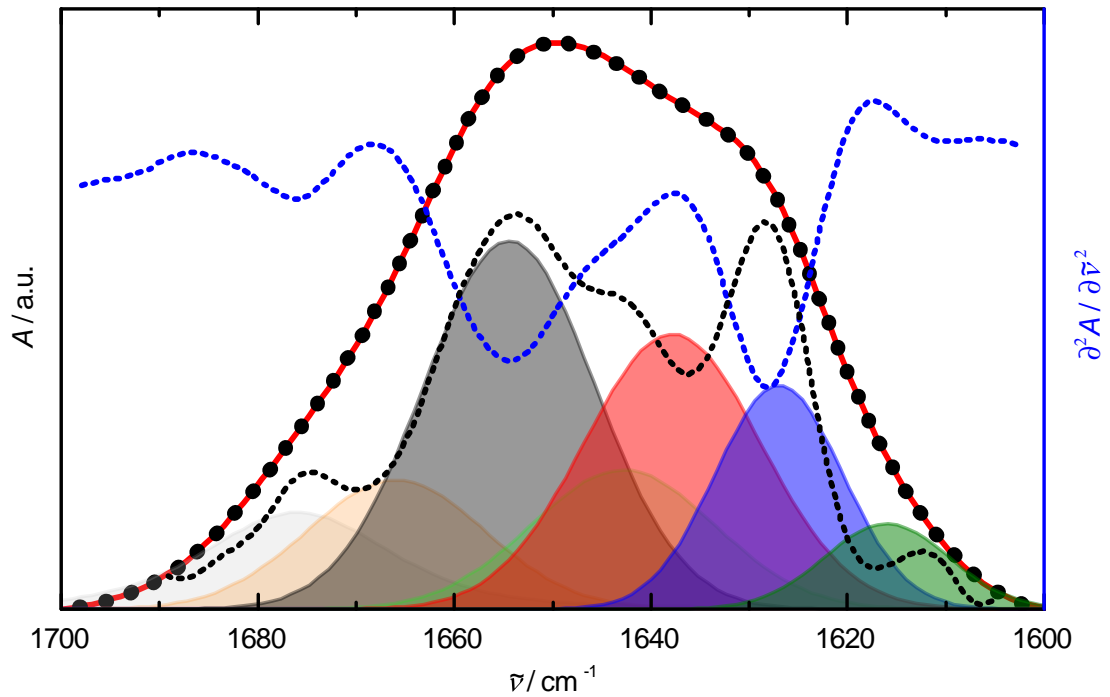
(Abb. 3.13 A, 2-fache Vergrößerung). Die Kompression von Aktinfilamenten führt zu signifikanten morphologischen Veränderungen innerhalb der Quartärstruktur des Filaments (Abb. 3.13 B-E). Ein Druckanstieg auf 1.5 kbar resultiert zunächst in einer Störung der helikalen Filamentstruktur. Ähnliches wurde bereits in einer Studie von Garcia et al. beschrieben, wobei hier ausschließlich ein Druck von ~2.4 kbar analysiert wurde, der ebenfalls zu einer Störung der helikalen Struktur der Filamente führte.<sup>[190]</sup> Eine weitere Erhöhung des Drucks auf 3 kbar führt zu einer weiteren Veränderung der Quartärstruktur, wobei unter diesen Bedingungen bereits eine Verkürzung von Aktinfilamenten ersichtlich wird. Bei einem Druck von 4 kbar sind nur noch einige wenige Filamente sichtbar. Ein Großteil liegt bereits in dissoziierter, monomerer Form oder

in kleinen Clustern vor. Wird der Maximaldruck von 5 kbar appliziert, sind keinerlei Aktinfilamente mehr erkennbar. Dieser hohe Druck führt zur kompletten Dissoziation der Filamente, sodass ausschließlich die monomere Spezies und kleine Proteincluster vorliegen (~10-50 nm). Der Vergleich der dargestellten druckinduzierten morphologischen Effekte auf die Struktur von F-Aktin ist in sehr guter Übereinstimmung mit den bereits vorgestellten FTIR-spektroskopischen Daten. Diese Analysen zeigen, dass erste Effekte auf die Sekundärstrukturelemente von Aktinfilamenten bei Drücken von ~1-1.5 kbar auftreten und der komplette Entfaltungs- und Dissoziationsprozess bei ~5.5-6 kbar abgeschlossen ist. Um thermisch induzierte morphologische Veränderungen der Proteinstruktur zu visualisieren, wurden Proben von Aktinfilamenten bei einer Temperatur von 90 °C für einen Zeitraum von 20 min inkubiert (Abb. 3.13 F). Die Bildung von sehr großen amorphen Proteinaggregaten (bis zu ~500 nm) ist klar zu erkennen. Auch dieses Ergebnis ist in sehr guter Übereinstimmung mit den zuvor vorgestellten FTIR-spektroskopischen Messungen, die bei einer Erhöhung der Temperatur einen Anstieg von intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern zur Folge haben, die charakteristisch für eine erfolgte Proteinaggregation sind. DSC-Messungen zeigen ebenfalls einen exothermen Peak (Peak 4) nach dem auftretenden Übergangspeak (Subpeak 1, 2, 3). Dieser exotherme Peak ist ebenfalls ein Charakteristikum für eine auftretende Proteinaggregation, da eine Zusammenlagerung von Proteinen mit der Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen verbunden ist und somit dieser Prozess zumeist exotherm ist.

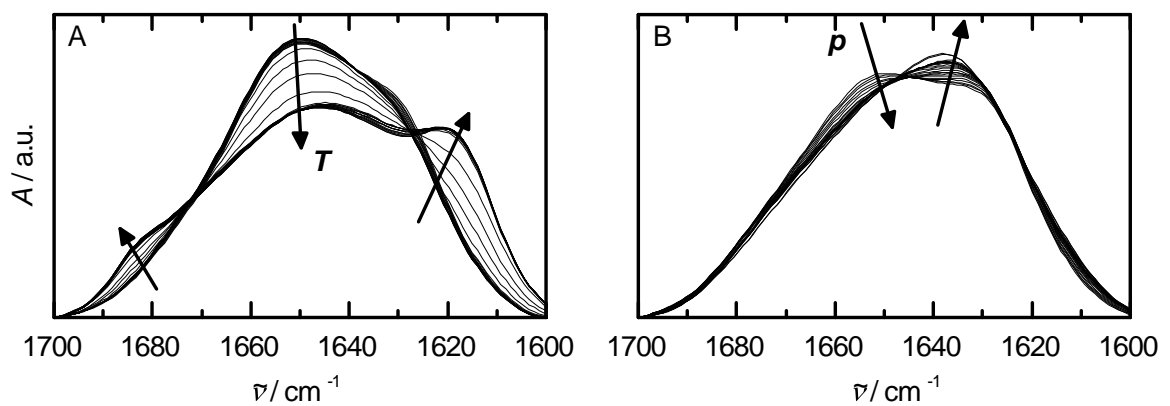
### **Temperatur- und Druckeffekte auf B-Aktin**

In Abbildung 3.14 ist die Amid-I'-Bande von B-Aktin in nativer Konformation bei 20 °C und Atmosphärendruck dargestellt. Ebenfalls eingezeichnet sind die Subbanden, die im Folgenden zur Analyse von Temperatur- und Druckeffekten dienen. Diese Banden wurden anhand der 2. Ableitung und des FSD-Spektrums der Amid-I'-Bande von B-Aktin ermittelt. Die Auswirkungen von steigender Temperatur (A) bei Atmosphärendruck und steigendem Druck (B) bei einer Temperatur von 25 °C auf die Amid-I'-Bande von B-Aktin sind in Abbildung 3.15 exemplarisch dargestellt. Die unterschiedliche Beeinflussung der beiden Parameter ist bereits gut erkennbar und wird im Folgenden genauer analysiert.



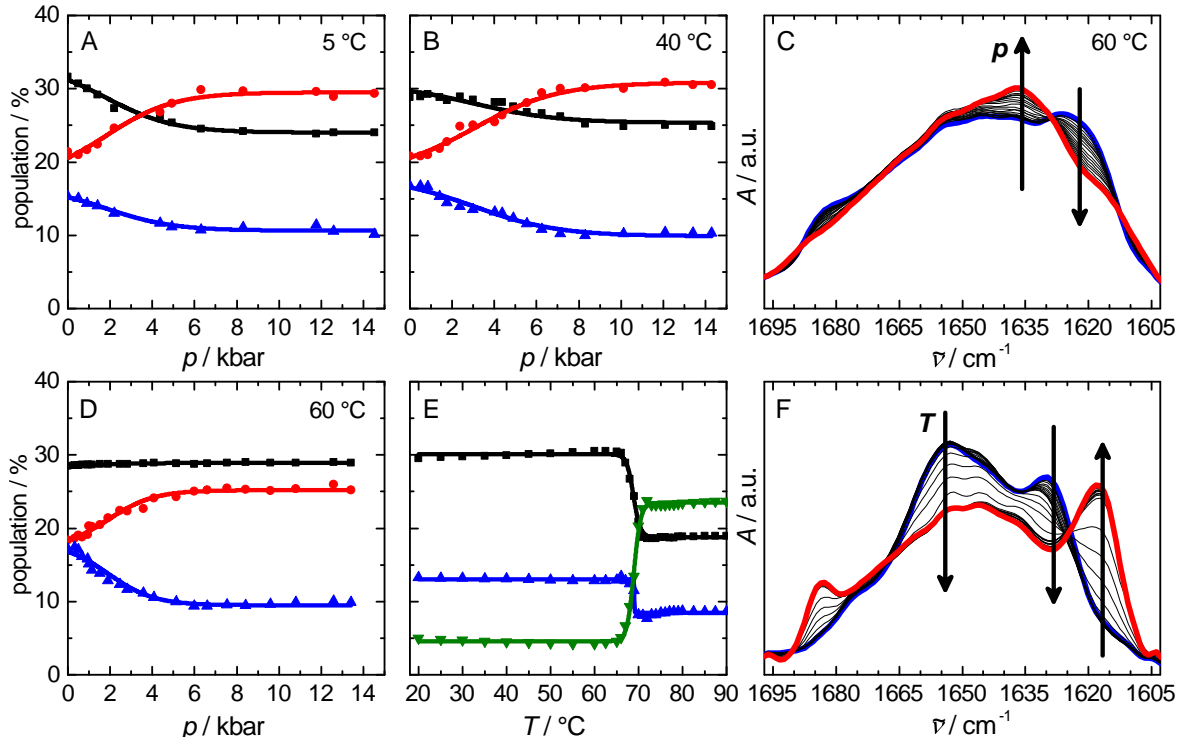


**Abbildung 3.14:** Amid-I'-Bande von B-Aktin (●) bei 20 °C und Atmosphärendruck. Zur Ermittlung von Subbanden wurde die Amid-I'-Bande entfaltet (schwarz gestrichelte Linie) und die 2. Ableitung gebildet (blau gestrichelte Linie). Die zur Funktionsanpassung (rote Linie) verwendeten Subbanden sind ebenfalls eingezeichnet.



**Abbildung 3.15:** Effekt von Temperatur (A) und Druck (B) auf die Amid-I'-Bande von B-Aktin. Teilabbildung A zeigt die auftretenden Veränderungen der Amid-I'-Bande in einem Temperaturintervall zwischen 20 und 90 °C bei Atmosphärendruck. In Teilabbildung B sind die druckabhängigen Effekte in einem Bereich von 1 bar bis ~10 kbar bei einer Temperatur von 25 °C dargestellt. Pfeile zeigen in Richtung steigender Temperatur bzw. steigendem Druck.



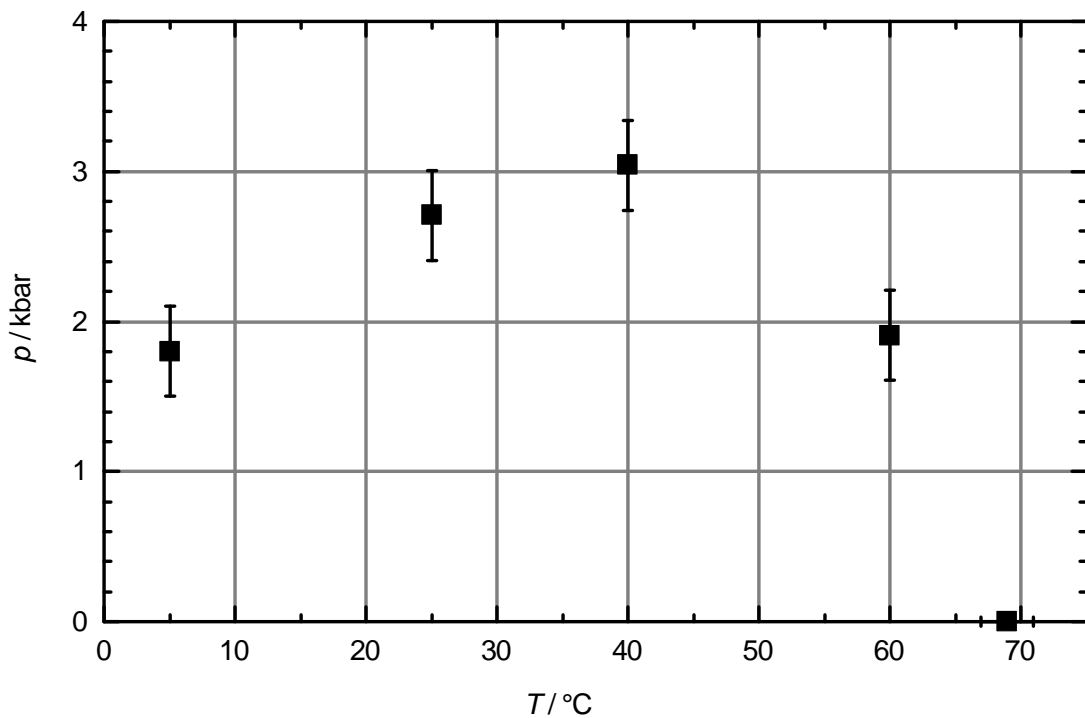


**Abbildung 3.16:** Temperatur- und druckabhängige FTIR-spektroskopische Analysen von B-Aktin. Änderungen ausgewählter Sekundärstrukturelemente bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit des Drucks (A, B, D) und temperaturabhängige Änderungen bei Atmosphärendruck (E). An die erhaltenen Daten wurden die Boltzmannfunktionen 3.1 und 3.2 angepasst (als jeweilige Linie dargestellt). Druck-(C) und temperaturabhängige (F) Änderungen des Absorptionssignals der entfaltenen Amid-I'-Bande von F-Aktin. ■  $\alpha$ -Helix ( $1655\text{ cm}^{-1}$ ), ● intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1635\text{ cm}^{-1}$ ), ▲ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1627\text{ cm}^{-1}$ ), ▼ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1616\text{ cm}^{-1}$ ).

Abbildung 3.16 zeigt temperatur- und druckinduzierte Änderungen der Sekundärstrukturelemente von Aktinbündeln. Die native Konformation von B-Aktin weist zwei Hauptbanden bei Wellenzahlen von  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha$ -Helices) und  $\sim 1628\text{ cm}^{-1}$  (intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter) auf (Abb. 3.16 F). Wird die Temperatur erhöht, reduziert sich der Anteil dieser Strukturen dramatisch im Falle der  $\alpha$ -Helices von  $\sim 30\%$  auf  $\sim 19\%$  und die Population an intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern verringert sich um  $\sim 6\%$ . Gleichsam ist im selben Temperaturintervall, in dem der Übergang zu verzeichnen ist ( $\sim 65\text{--}72\text{ °C}$ ), ein signifikanter Anstieg typischer Aggregationsbanden (intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter mit Absorptionsmaxima bei  $\sim 1616\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1685\text{ cm}^{-1}$ ) um  $\sim 19\%$  ersichtlich. Eine globale Funktionsanpassung an die erhaltenen Daten mittels Formel 3.1, in Abbildung 3.16 F dargestellt, liefert eine Übergangstemperatur von  $68.9 \pm 2\text{ °C}$  und eine Änderung der

VAN'T HOFF Enthalpie  $\Delta H_{u,vH}^0$  von  $1120 \pm 175 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

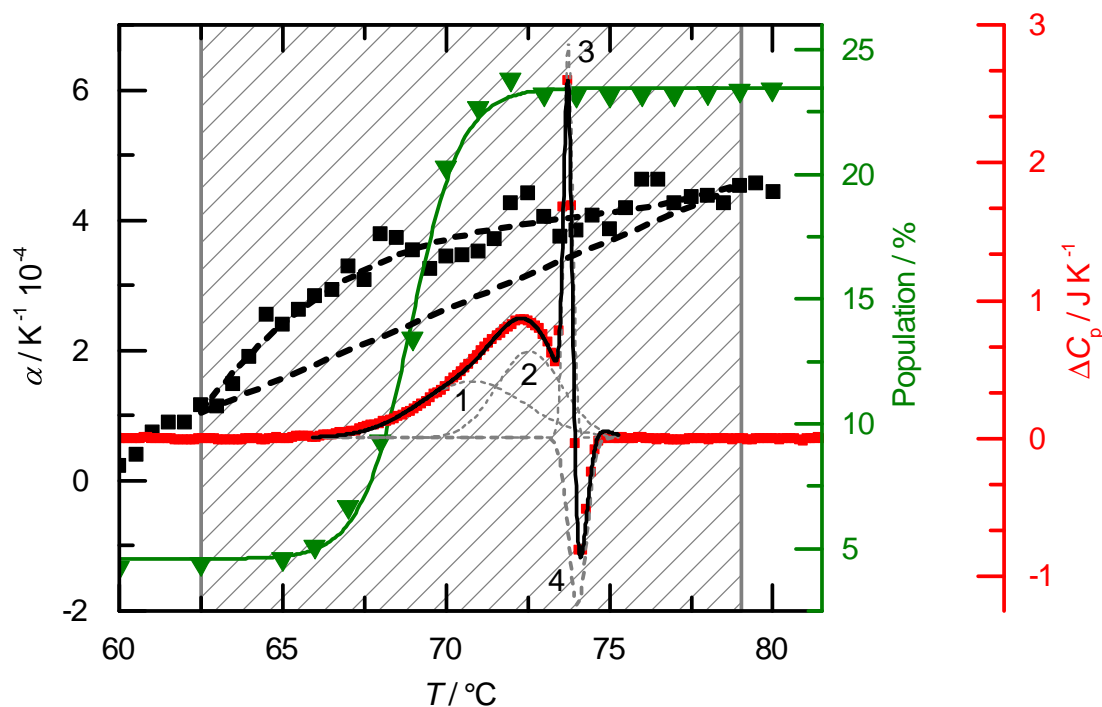
Die Druckapplikation der Probe wirkt sich maßgeblich auf die Populationen von  $\alpha$ -Helices ( $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ ) und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 1627$  und  $1635 \text{ cm}^{-1}$ ) aus. So sinkt der Anteil an  $\alpha$ -Helices mit steigendem Druck bei konstanten Temperaturen von 5, 25 und  $40^\circ\text{C}$ . Interessanterweise ist dieser Effekt bei einer Temperatur von  $60^\circ\text{C}$  nicht mehr zu beobachten (Abb. 3.16 A, B, D). Der prozentuale Anteil der  $\beta$ -Faltblatt-Spezies mit stärker ausgeprägten Wasserstoffbrücken ( $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$ ) sinkt mit steigendem Druck und gleichsam steigt die Population der  $\beta$ -Faltblätter mit schwächeren Wasserstoffbrücken bei einer Wellenzahl von  $\sim 1635 \text{ cm}^{-1}$ . Die Übergangsdrücke  $p_m$  liegen für Temperaturen von 5, 25, 40 und  $60^\circ\text{C}$  bei 1.8, 2.7, 3.1 und 1.9 kbar (Abb. 3.17) und die damit verbundenen Volumenänderungen  $\Delta V_u$  betragen -14, -9, -13 und  $-26 \text{ mL mol}^{-1}$ . Es wird ersichtlich, dass sowohl die temperatur- als auch die druckabhängige Entfaltung des Proteins mit einem Verlust an  $\alpha$ -Helices und der stärker Wasserstoffbrücken-gebundenen  $\beta$ -Faltblatt-Spezies ( $1627 \text{ cm}^{-1}$ ) verbunden ist. Der Effekt bzgl. der  $\beta$ -Faltblatt-Spezies absorbierend bei  $1635 \text{ cm}^{-1}$  ist unterschiedlich: Eine Kompression der Probe führt zu einem Anstieg dieser  $\beta$ -Faltblätter. Hingegen hat eine



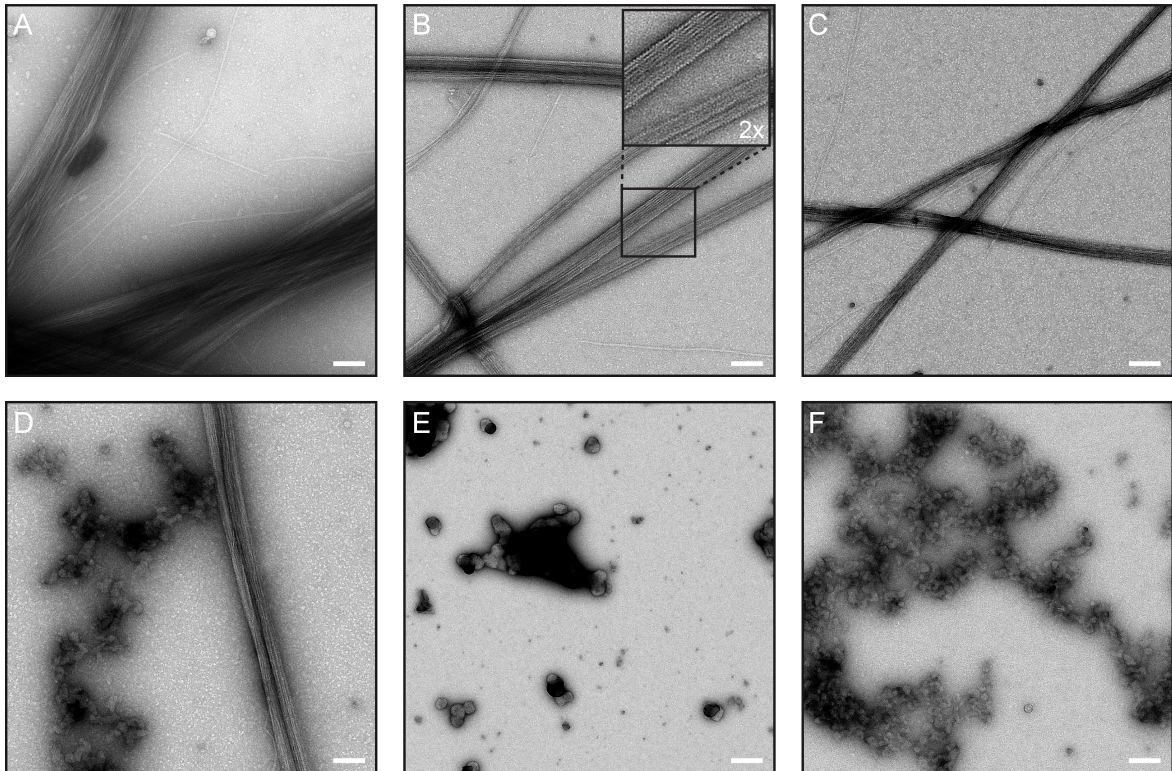
**Abbildung 3.17:**  $p$ - $T$ -Phasendiagramm von B-Aktin.

Erhöhung der Temperatur keinen signifikanten Effekt auf diese Sekundärstrukturspezies.

Die durchgeführten kalorimetrischen Studien an B-Aktin sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Das erhaltene DSC-Thermogramm zeigt einen Übergang zwischen 68 und 76 °C und die einhergehende Enthalpieänderung  $\Delta H_{u,cal}^0$  wurde zu  $986 \pm 65 \text{ kJ mol}^{-1}$  bestimmt. Wie in Abbildung 3.18 dargestellt, kann der DSC-Peak mittels FSD-Methoden in mehrere Subpeaks entfaltet werden, die wie folgt interpretiert werden: Subpeaks 1 und 2 mit Maxima bei 70.8 und 72.5 °C werden der partiellen Entfaltung von Aktinmonomeren innerhalb des Filaments zugeschrieben. Der wesentlich schärfere Peak 3 bei einer Temperatur von 73.7 °C ist vermutlich auf einen hochkooperativen Dissoziationsprozess der Aktinbündel zurückzuführen. Im Anschluss ist ein exothermer Ausschlag (Peak 4) ersichtlich, der auf eine Proteinaggregation hindeutet. Die erhaltenen DSC-



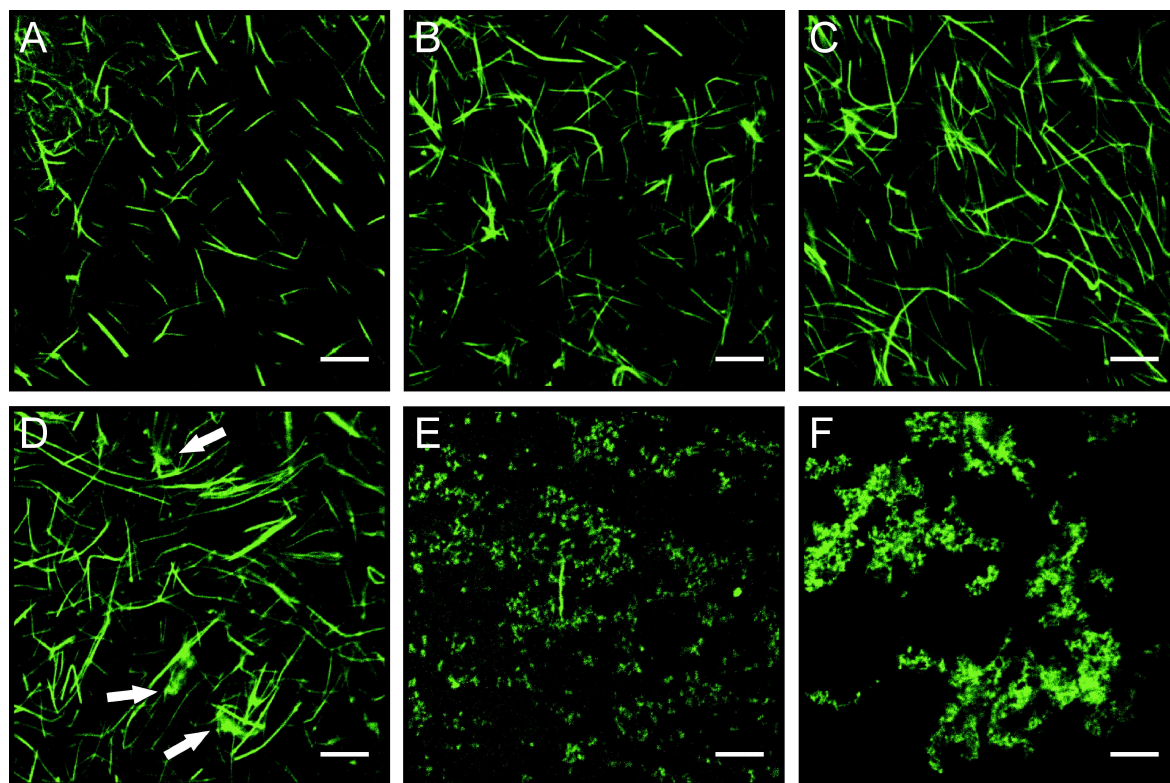
**Abbildung 3.18:** Kalorimetrische Analyse von B-Aktin. Das mittels DSC erhaltene Thermogramm wurde mittels vier GAUSS-Funktionen (grau gestrichelte Linien) angepasst (schwarze Linie). Die erhaltenen PPC-Daten (■) wurden im Bereich des thermischen Übergangs (grau schraffierter Bereich) integriert (schwarz gestrichelte Linien). Ebenfalls ist zum Vergleich die Temperaturabhängigkeit der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $1616 \text{ cm}^{-1}$ ) (▼) aus den bereits vorgestellten FTIR-Experimenten eingezeichnet.



**Abbildung 3.19:** Mikrofotografien von B-Aktin mittels TEM. B-Aktin-Proben wurden verschiedenen Drücken für einen Zeitraum von 20 min ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben dekomprimiert und mikroskopiert (A-E). TEM-Aufnahmen von B-Aktin bei Atmosphärendruck (A) und nach Druckapplikation von 1.5 kbar (B), 2.5 kbar (C), 3.5 kbar (D) und 5 kbar (E). Zur Visualisierung der thermisch induzierten Aggregation des Proteins wurde die Probe bei einer Temperatur von 90 °C für einen Zeitraum von 20 min inkubiert (F). Maßstabsskala: 100 nm (E: 200 nm). Die TEM-Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit von Julian von der Ecken (MPI Dortmund, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Stefan Raunser) durchgeführt.

Daten sind in guter Übereinstimmung mit den temperaturabhängigen FTIR-Daten, da im selben Temperaturintervall Veränderungen der jeweiligen Signale observabel sind. Die Integration des thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha(T)$  liefert die Volumenänderung  $\Delta V_u$  die mit dem thermisch induzierten Übergang bei Atmosphärendruck einhergeht und wurde zu einem positiven Wert von  $34 \pm 20 \text{ mL mol}^{-1}$  bestimmt. Dies macht einen prozentualen Anteil von  $\sim 0.13\%$  vom Gesamtvolumen des Proteins aus.

Abbildung 3.19 A zeigt eine Mikrofotografie von frisch präparierten Aktinbündeln, die sich nach Zugabe von 50 mM  $\text{MgCl}_2$  zu Lösungen von F-Aktin axial zusammengelagert haben. Eine Kompression der Probe bis zu einem Druck von 2.5 kbar (Abb. 3.19 B, C) führt zu keinerlei signifikanten morphologischen Veränderungen der Proteinsupra-



**Abbildung 3.20:** Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von B-Aktin. B-Aktin-Proben wurden verschiedenen Drücken für einen Zeitraum von 20 min ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben dekomprimiert und mikroskopiert (A-E). B-Aktin bei Atmosphärendruck (A) und nach Druckapplikation von 1.5 kbar (B), 2.5 kbar (C), 3.5 kbar (D) und 5 kbar (E). Zur Visualisierung der thermisch induzierten Aggregation des Proteins wurde die Probe bei einer Temperatur von 90 °C für einen Zeitraum von 20 min inkubiert (F). Pfeile zeigen auf erste dissoziierte Bündelstrukturen, die sich bei 3.5 kbar zu kleinen Aggregaten assemblieren. Maßstabsskala: 10 µm.

struktur. Erste Proteincluster, die vermutlich durch druckinduzierte Dissoziationsprozesse entstanden sind, assemblieren erst bei einem Druck von ~3.5 kbar (Abb. 3.19 D). Nach der Druckapplikation von 5 kbar sind zum einen keinerlei Aktinbündel mehr auszumachen und zum anderen treten wenige kleine Proteincluster auf. Um den thermisch induzierten Aggregationsprozess von Aktinbündeln zu visualisieren, wurden diese bei einer Temperatur von 90 °C für einen Zeitraum von 20 min inkubiert. In Abbildung 3.19 F wird ersichtlich, dass sich bei hohen Temperaturen sehr große, amorphe Proteinaggregate ausbilden, in guter Übereinstimmung mit den bereits vorgestellten FTIR- und kalorimetrischen Studien. Um ebenfalls Informationen über topologische Veränderungen der Bündelstrukturen in einem größeren Maßstab zu erhalten, wurden die präparierten Proben an Aktinbündeln nach erfolgter Druck- bzw. Temperaturbehand-



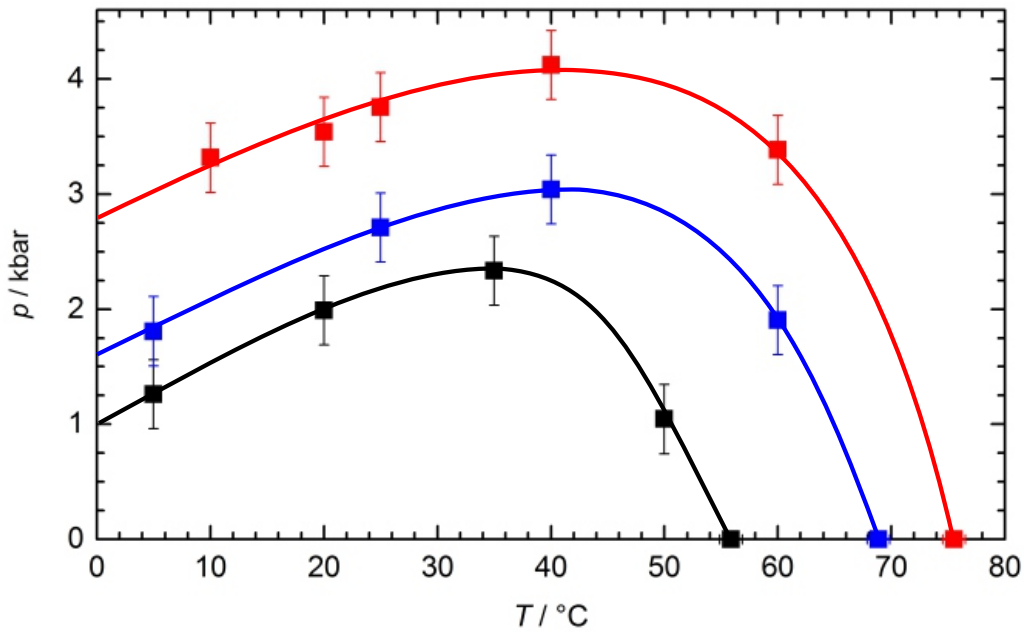
lung mittels Phalloidin, einem Fluorophor, der eine hohe Affinität zu Aktinfilamenten aufweist, versetzt und anschließend mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie visualisiert. Bei dem Vergleich der TEM-Mikrofotografien (Abb. 3.19) mit den Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen (Abb. 3.20) von temperatur- und druckbehandelten Aktinbündeln fällt auf, dass sich sowohl der Temperatur- (Abb. 3.20 F) als auch der Druckeffekt (Abb. 3.20 A - E) ebenfalls in makroskopischem Maßstab widerspiegeln. Eine Kompression der Probe zeigt ebenfalls ab einem Druck von  $\sim 3.5$  kbar erste Veränderungen der Bündelmorphologie und bei einem Druck von 5 kbar ist die Dissoziation der Bündel und die Zusammenlagerung zu kleineren Clustern erfolgt. In Teilabbildung 3.20 F wird das Ausmaß der thermisch induzierten Aggregation noch etwas besser klar, da mittels Laser-Raster-Mikroskopie ein wesentlich größerer Bereich observiert werden kann. Es wird ersichtlich, dass amorphe Aggregatstrukturen Längen in der Größenordnung mehrere Mikrometer einnehmen können.

### **Vergleich der Stabilität von G-Aktin, F-Aktin und B-Aktin**

Durch FTIR-Experimente konnte dargestellt werden, dass bei allen analysierten Aktinspezies (Monomer, Filament, Bündel) eine Temperaturerhöhung dazu führt, dass vorhandene Sekundärstrukturpopulationen an  $\alpha$ -Helices und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern verringert werden, wobei Populationen an intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern akkumulieren. Diese Veränderungen der Sekundärstrukturanteile hat bei allen Aktinspezies eine nicht-filamentöse, amorphe Aggregation der Proteine zur Folge. Diese thermisch induzierte Zusammenlagerung von teils sehr großen Proteinaggregaten konnte im Falle von F- und B-Aktin ebenfalls mittels bildgebenden Verfahren (TEM und CLSM) visualisiert werden (Abb. 3.13, 3.19 und 3.20). Der druckinduzierte Entfaltungsprozess hingegen inhibiert diesen Aggregationsprozess. Dieses Phänomen wurde bereits bei amyloidähnlichen Proteinen beobachtet.<sup>[132,191]</sup> Die temperaturabhängigen FTIR-Studien haben gezeigt, dass F-Aktin mit einer Übergangstemperatur von  $75.5^\circ\text{C}$  die höchste Stabilität gegenüber thermischen Einflüsse aufweist, gefolgt von B-Aktin ( $T_m = 68.9^\circ\text{C}$ ). Die niedrigste Übergangstemperatur von  $56.0^\circ\text{C}$  wies die monomere Struktur des Proteins auf. Im Vergleich zu G-Aktin, das einen biphasischen Entfaltungsprozess aufweist, zeigen die Aktinfilamente und -bündel komplexere triphasische

Entfaltungsprozesse und wesentlich größere Entfaltungsenthalpien auf. Die Erklärung hierfür ist wahrscheinlich die zusätzlich energetisch günstigen ausgebildeten intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der Suprastrukturen. Im Falle von F- und B-Aktin folgt auf die partielle Entfaltung der Protomere ein hochkooperativer Dissoziationsprozess der Suprastrukturen und eine anschließende amorphe Aggregation der thermisch entfalteten Monomere. Jedes Protomer innerhalb eines Aktinfilamentes ist in Kontakt mit vier benachbarten Protomeren.<sup>[192]</sup> Diese zusätzlichen Protein-Protein-Interaktionen führen zu einer höheren Entfaltungsenthalpie  $\Delta H_{u,cal}^0$  im Vergleich zur monomeren Spezies (+510 kJ mol<sup>-1</sup>). Die Analyse von Aktinbündeln weist eine Erhöhung der Entfaltungsenthalpie um +622 kJ mol<sup>-1</sup> im Vergleich zu G-Aktin auf. Die Enthalpieerhöhung dieser Struktur ist vermutlich auf weitere Protein-Protein-Interaktionen zurückzuführen, da Aktinbündel durch die Zugabe von 50 mM MgCl<sub>2</sub> zu F-Aktin-Lösungen hergestellt wurden. Diese Bündel bestehen aus dicht aneinander gelagerten Aktinfilamenten, wodurch es zu weiteren Protein-Protein-Wechselwirkungen und somit zu einer Erhöhung der Entfaltungsenthalpie kommt. Die Steigerung der Entfaltungsenthalpien des Entfaltungs-/Dissoziationsprozesses  $\Delta H_{u,vH}^0$  von F-Aktin und B-Aktin im Vergleich zur monomeren Spezies wurden ebenso durch die FTIR-spektroskopischen Messungen bestätigt.

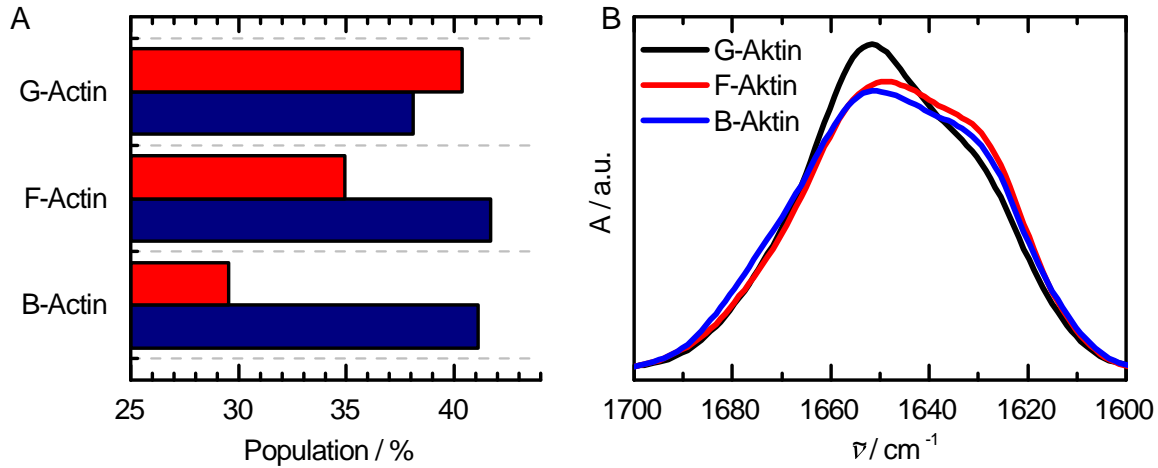
Druckabhängige Effekte auf die Sekundärstrukturelemente von G-, F- und B-Aktin wurden mittels FTIR-Spektroskopie nachgewiesen. Diese Methode ermöglicht zudem die Bestimmung von Übergangsdrücken der Entfaltungs-/Dissoziationsprozesse und die Berechnung von Volumenunterschieden zwischen dem druckdenaturierten und nativen Zustand eines Proteins bei verschiedenen Temperaturen. Abbildung 3.21 zeigt das  $p, T$ -Stabilitätsdiagramm von G-, F- und B-Aktin. Es wird klar ersichtlich, dass die monomere Spezies, G-Aktin, nicht nur die geringste Temperatur- sondern auch die geringste Druckstabilität aufweist. Im Temperaturbereich von 5-50 °C weist G-Aktin Entfaltungsdrücke zwischen 1 und 2.3 kbar auf. B-Aktin hingegen besitzt eine höhere Druckstabilität als G-Aktin und F-Aktin ist die druckresistenteste Struktur (bis zu ~4 kbar) in dieser Studie. Die druckinduzierten Volumenänderungen, die während des Entfaltungsprozesses auftreten, zeigen allesamt ein negatives Vorzeichen (in Übereinstimmung mit dem Prinzip von LE CHÂTELIER) und sind überraschender-



**Abbildung 3.21:**  $p, T$ -Stabilitätsdiagramm von monomerem (■), filamentösem (■) und gebündeltem (■) Aktin.

weise bei allen Aktinspezies sehr ähnlich. Da die Volumenänderungen ebenfalls sehr klein sind ( $\Delta V_u = [-10, -45] \text{ mL mol}^{-1} \cong \mathcal{O}(V = \sim 1-3 \text{ Wassermoleküle})$ ) ist davon auszugehen, dass die Aminosäuren nicht nur innerhalb von G-Aktin, sondern auch im Falle der supramolekularen Strukturen sehr dicht gepackt sind. Somit können Proteinhölräume bzw. Packungsdefekte, die als Haupttriebkkräfte bei der Druckdenaturierung von Proteinen angenommen werden,<sup>[106,109]</sup> nicht die einzigen Größen darstellen, die zu den verschiedenen Druckstabilitäten der drei Aktinspezies führen. Darüber hinaus könnten auch Unterschiede in der Hydratation, die von den chemischen Eigenschaften und der Oberfläche des Proteins, die für das Solvens zugänglich ist, eine Rolle für die Druckstabilität spielen. Im Falle der höheren Druckstabilität der Aktinsuprastrukturen ist es wahrscheinlich, dass intra- und intermolekulare Wechselwirkungen von  $\beta$ -Faltblättern diesen Effekt verursachen. Die Sekundärstrukturanalyse der Amid-I'-Bande der verschiedenen Aktinspezies zeigt, dass G-Aktin einen etwas höheren Anteil an  $\alpha$ -Helices und geringeren Anteil an  $\beta$ -Faltblättern aufweist als Aktinfilamente oder -bündel (3.22). Bei der G-zu-F-Transformation von Aktin wird eine rechtsgängige Helix assembliert, in der jedes Aktinprotomer in Kontakt mit vier benachbarten Protomeren kommt und somit zusätzliche intermolekulare Protein-Protein-Interaktionen

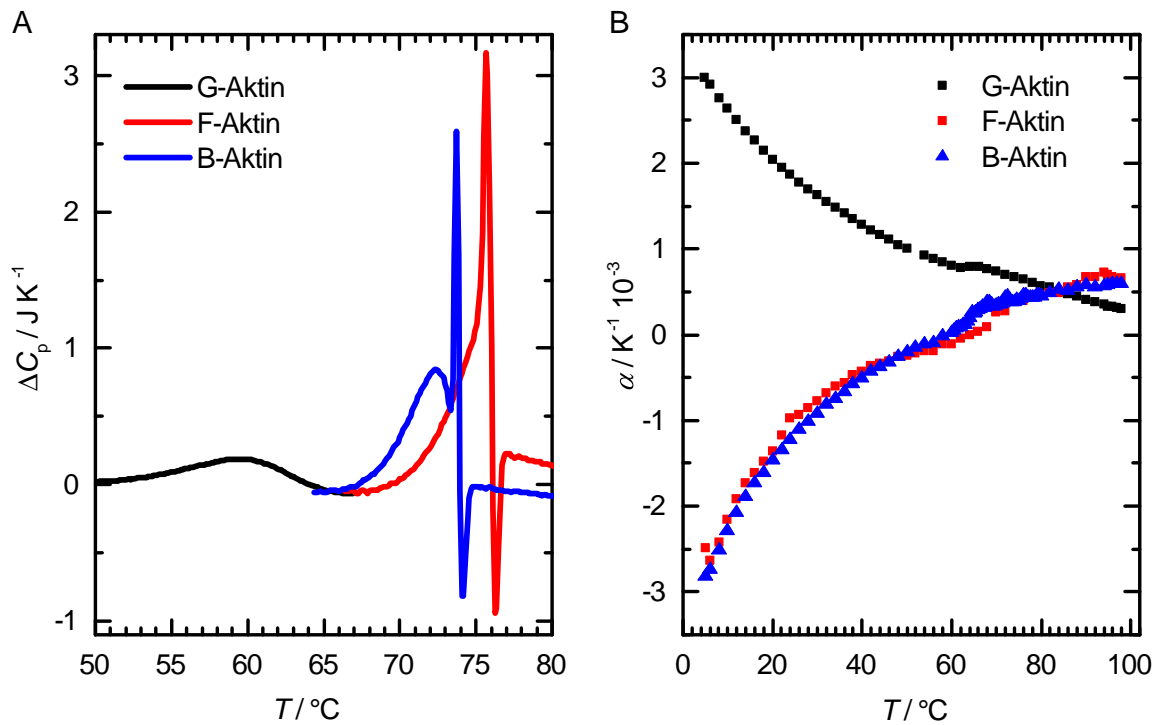




**Abbildung 3.22:** Vergleich der Populationen an  $\alpha$ -Helices (rot) und der Gesamtheit an  $\beta$ -Faltblättern (dunkelblau) der Proteinsekundärstrukturen von G-, F- und B-Aktin bei 20 °C (A). Vergleich der zugehörigen Amid-I'-Banden von monomerem, filamentösem und gebündeltem Aktin bei 20 °C (B).

ausgeprägt werden. Als unmittelbare Folge ist die Stabilisierung der Aktinsuprastrukturen im Vergleich zum Monomer höchstwahrscheinlich in enthalpischen Änderungen begründet. F-Aktin weist bei einer Temperatur von 25 °C einen um etwa 1.5 kbar gesteigerten Entfaltungsdruck  $p_u$  und bei Atmosphärendruck eine um 19.5 °C erhöhte Entfaltungstemperatur  $T_m$  im Vergleich zu G-Aktin auf. Dies spiegelt sich ebenfalls in einer 2.4-fach gesteigerten Enthalpieänderung  $\Delta H_{u,cal}^0$  wider, die während des thermisch induzierten Entfaltungs-/Dissoziationsprozesses auftritt. Im Falle von B-Aktin ist die Stabilität der Proteinstruktur im Vergleich zu G-Aktin ebenfalls erhöht ( $\Delta p_u(25^\circ\text{C}) \approx 0.4 \text{ kbar}$ ,  $\Delta T_m(1 \text{ bar}) \approx 12.9^\circ\text{C}$ ), allerdings im Vergleich zu F-Aktin geringer. Die höhere Temperatur- und Drucksensitivität von B-Aktin im Vergleich zu F-Aktin könnte auf destabilisierenden, intermolekularen Wechselwirkungen beruhen, die entstehen, wenn sich Aktinfilamente axial zusammenlagern. Veränderungen in der Sekundärstruktur, die bei der Bündelassemblierung auftreten, unterstützen diese Schlussfolgerung (vgl. F- und B-Aktin Abb. 3.22). Im Vergleich zum druckinduzierten Entfaltungs-/Dissoziationsszenario von F- und B-Aktin ergeben die berechneten Volumenänderungen  $\Delta V_u$  des thermisch induzierten Entfaltungs-/Dissoziationsszenarios positive Werte von  $\sim 30 \text{ mL mol}^{-1}$ . Dies kann u.a. durch die Temperaturabhängigkeit des Expansionskoeffizienten von nativem und entfaltetem Zustand des Proteins erklärt werden: Sollte z.B. der Expansionskoeffizient des entfalteten Zustandes bei ho-

hen Temperaturen kleiner als der des gefalteten Zustandes werden, kann  $\Delta V_u$  ebenfalls bei hohen Temperaturen das Vorzeichen wechseln (vgl. Formel 3.3). Dies wurde bereits für das Protein SNase und dessen Mutationen beschrieben.<sup>[106,109]</sup> Zusätzlich könnte die Volumenzunahme auch durch die nach dem Entfaltungsprozess auftretende Aggregation erfolgen, die bei der druckinduzierten Entfaltung nicht erfolgt. Wie in Abbildung 3.23 B noch einmal verdeutlicht wird, weist der thermische Expansionskoeffizient  $\alpha(T)$  von G-Aktin eine unterschiedliche Steigung im Vergleich zu dem von F- und B-Aktin auf. Dies deutet auf unterschiedliche Hydratationseigenschaften der Aktinspezies hin. Es wurde bereits gezeigt, dass  $\alpha(T)$  stark von den Hydratationseigenschaften der Protein-Wasser-Grenzfläche abhängt.<sup>[106,109,193,194]</sup> Allgemein wird beobachtet, dass stark geladene, polare Proteine mit überwiegendem Anteil an hydrophilen Seitenketten in Relation zu apolaren Gruppen an der Protein-Wasser-Grenzfläche, hohe Werte für  $\alpha(T)$  bei niedrigen Temperaturen haben, die mit zunehmender Temperatur stark abnehmen. Dieses Verhalten ist zudem charakteristisch für die Wasserstruktur brechende (chaotrope) Substanzen. Im Gegensatz hierzu weisen strukturbildende (kosmotrope) Substanzen bzw. apolare Proteinseitenketten oder Aminosäuren (hydrophobe Hydratation) bei niedrigen Temperaturen einen niedrigen Wert für  $\alpha(T)$ , der mit steigender Temperatur zunimmt, wie es bei F- und B-Aktin der Fall zu sein scheint (Abb. 3.23). Dies liegt vermutlich daran, dass sich zunächst um hydrophobe Bereiche der Proteinoberfläche von F- und B-Aktin eine Hydratschicht bildet und somit die Wasserstruktur geordneter wird. Mit steigender Temperatur kommt es, aufgrund von strukturellen Veränderungen des Proteins, zunehmend zur Exposition von polaren Seitenketten, basierend auf dem fortschreitenden thermisch induzierten Entfaltungsprozess. Und tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass Wassermoleküle der Hydratschicht um G-Aktin wesentlich mobiler sind als im Falle der Wassermoleküle innerhalb der Protein-Wasser-Grenzfläche von F-Aktin.<sup>[195]</sup> Zudem ist diese Erklärung ebenso mit der negativen spezifischen adiabatischen Kompressibilität von F-Aktin ( $\beta_S = -12.7 \times 10^{13} \text{ m}^2 \text{ N}^{-1}$ ) im Vergleich zu G-Aktin ( $\beta_S = 9.3 \times 10^{13} \text{ m}^2 \text{ N}^{-1}$ ) konsistent.<sup>[188]</sup> Des Weiteren soll erwähnt werden, dass es ebenfalls durch die Zugabe eines Überschusses an  $\text{MgCl}_2$  zu Veränderungen des thermischen Expansionskoeffizienten kommen könnte, da es sich um ein kosmotropes Salz, also einen Strukturbildner, handelt.<sup>[196]</sup> Al-



**Abbildung 3.23:** DSC-Thermogramme (A) und isothermer Ausdehnungskoeffizient  $\alpha(T)$  (B) von G-, F- und B-Aktin im Vergleich.

lerdings scheint dieser Effekt vernachlässigbar, da eine Korrelation zwischen Konzentration an Strukturbildner und Steigung von  $\alpha(T)$  zu erwarten wäre,<sup>[193]</sup> diese aber nicht vorhanden ist (vgl.  $\alpha(T)$  F-Aktin (2 mM  $\text{MgCl}_2$ ) vs.  $\alpha(T)$  B-Aktin (50 mM  $\text{MgCl}_2$ ) in Abb. 3.23).

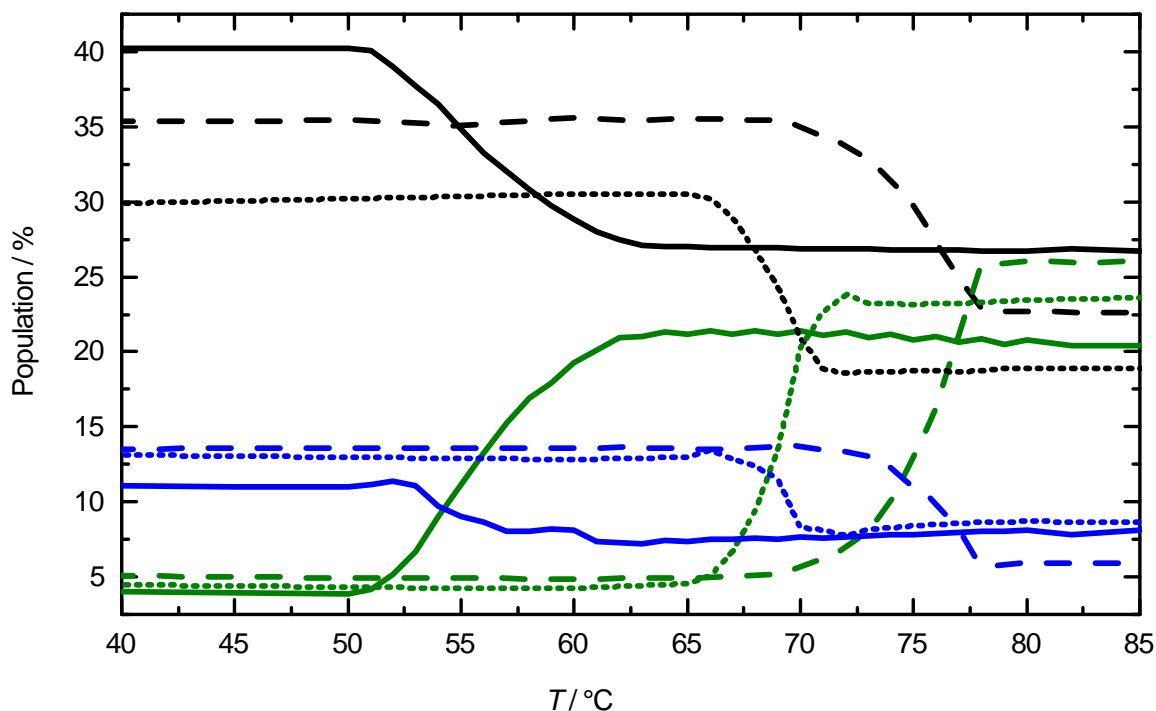
### 3.2.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Applikation von Druck auf Lebewesen, die an der Erdoberfläche leben, resultiert generell in signifikanten Änderungen der Morphologie und Aktivität ihrer Zellen. So konnte in *in vivo*-Studien gezeigt werden, dass die Kompression von Zellen bis hin zu mehreren hundert bar die Zerstörung/ Dissoziation von wesentlichen Bestandteilen des Zytoskeletts, wie Mikrotubuli oder Aktinfilamenten, zur Folge hat.<sup>[163–167]</sup> Des Weiteren existiert bekanntlich eine Korrelation zwischen der Abnahme von Aktinstressfasern und resultierenden Veränderungen der Form von Zellen.<sup>[168]</sup> Im Falle von *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Organisation der Strukturen des Zytoskeletts innerhalb der Zelle zu den drucksensitivsten biochemischen Prozessen ge-

hört, da Veränderungen bereits bei einem Druck von ~1 kbar auftreten. Während bei der Kompression der Zellen bei diesem Druck Aktinbündel in Bereichen von Sprossen und Knospen bereits dissoziierten, blieben kleinere Strukturen bestehend aus Aktinfilamenten zurück.<sup>[164]</sup>

Um ein tieferes Verständnis der Stabilität von verschiedenen Aktinstrukturen auf molekularer Ebene zu erhalten, wurden diese in dieser Studie in einem weitreichenden Temperatur- und Druckbereich studiert. Der thermisch-induzierte Entfaltungsprozess von F- und B-Aktin bei Atmosphärendruck beginnt mit einer partiellen Entfaltung der Protomerstruktur innerhalb des Filaments bzw. Bündels und im direkten Anschluss kommt es zu einem hochkooperativen Dissoziationsprozess der jeweiligen Suprastruktur, auf den die Aggregation der entfalteten Monomere folgt. Die signifikant höheren Übergangstemperaturen und -enthalpieänderungen von F- und B-Aktin im Vergleich zu G-Aktin lassen eine starke enthalpische Stabilisierung der Aktinsuprastrukturen erkennen. Es wurden ebenso drastische Unterschiede der Temperaturabhängigkeit des thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha(T)$  von G-Aktin im Vergleich zu F- und B-Aktin gefunden. Die positive Steigung von  $\alpha(T)$  im Falle von F- und B-Aktin lässt den Schluss zu, dass die Suprastrukturen von einem zusätzlichen Hydratationsnetzwerk umgeben sind, das vermutlich zur Stabilisierung dieser Strukturen beiträgt. Es konnte herausgefunden werden, dass G-Aktin nicht nur die geringste Stabilität bei Temperaturerhöhung aufweist, sondern ebenso bei Erhöhung des Drucks (Reihenfolge der Temperatur- und Druckstabilität der untersuchten Aktinspezies: G-Aktin < B-Aktin < F-Aktin). Interessanterweise wurde ebenfalls eine erhöhte Drucksensitivität für Kapsomere (monomere Kapsidproteine) im Vergleich zu deren ikosaedrischen Kapsid-Suprastrukturen im Falle von Viren gefunden.<sup>[13,197–199]</sup> Die in dieser Arbeit dargestellten Analysen der auftretenden Sekundärstrukturänderungen, die bei temperatur- oder druckinduzierter Entfaltung auftreten, zeigen, dass essentielle Unterschiede zwischen beiden Denaturierungsprozessen vorliegen. Während beim druckinduzierten Denaturierungsprozess eine Aggregation unterbunden wird, da dieser Prozess typischerweise mit einem Volumenanstieg des Systems verbunden wäre, folgt auf den irreversiblen thermisch induzierten Denaturierungsprozess die Zusammenlagerung großer Proteinaggregate. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Temperatur und Druck unterschiedliche Einflüsse auf die ein-

zelenen Sekundärstrukturelemente der untersuchten Aktinspezies aufweisen, wenngleich alle untersuchten Aktinstrukturen ein tendenziell identisches Verhalten aufweisen. Dies ist für den Fall der thermisch induzierten Entfaltung / Dissoziation in Abbildung 3.24 verdeutlicht.



**Abbildung 3.24:** Vergleich der thermisch induzierten Veränderungen der Populationen an  $\alpha$ -Helices ( $1655\text{ cm}^{-1}$ , schwarz), intramolekulare  $\beta$ -Faltblättern ( $1635\text{ cm}^{-1}$ , blau) und intermolekulare  $\beta$ -Faltblättern ( $1616\text{ cm}^{-1}$ , oliv) der unterschiedlichen Aktinspezies G-Aktin (durchgezogene Linie), F-Aktin (gestrichelte Linie) und B-Aktin (gepunktete Linie).

Im Falle der druckinduzierten Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesse werden die jeweiligen Sekundärstrukturelemente der jeweiligen Aktinspezies ebenfalls tendenziell identisch beeinflusst (vgl. Abb. 3.3, 3.10, 3.16; A-C). Der Vergleich des Einflusses von Temperatur und Druck auf die Sekundärstrukturelemente der Proteine hat gezeigt, dass beide Parameter zwar die Populationen an  $\alpha$ -Helices verringern, hingegen ist der jeweilige Einfluss auf  $\beta$ -Faltblattstrukturen gänzlich unterschiedlich. Die Sekundärstruktur von F-Aktin weist die höchste Stabilität gegen eine Erhöhung des Drucks auf und die mit dem Entfaltungsprozess einhergehenden Volumenänderungen sind sehr klein, sodass von einer sehr dichten Packung der Aminosäuren innerhalb des Filaments ausgegangen werden kann. Sehr ähnliche Werte wurden für den druckinduzierten Entfaltungsprozess

von Aktinbündeln und die damit einhergehenden Volumenänderungen gefunden. Die berechneten Werte für  $\Delta V_u$  liegen zwischen -10 und -45 mL mol<sup>-1</sup> und liegen somit in der Größenordnung von einigen wenigen Wassermolekülen. Diese Werte sind etwas kleiner als die Volumenänderungen, die typischerweise für monomere Proteine gefunden werden.<sup>[106]</sup> Interessanterweise stimmen die experimentell bestimmten Volumenänderungen von F-Aktin mit den, basierend auf Proteinhohlräumen theoretisch berechneten Werten ( $V_{\text{Proteinhohlraum}} = 29 \text{ mL mol}^{-1}$ ), sehr gut überein. Die Anzahl und Größe von Hohlräumen innerhalb der Struktur eines Proteins wird häufig als die maßgebliche Triebkraft für den druckinduzierten Entfaltungsprozess postuliert.<sup>[104–106,109]</sup> Da in dieser Studie sowohl für die monomere, als auch für die filamentöse und gebündelte Aktinstruktur sehr ähnliche Werte für die auftretenden Volumenänderungen bestimmt wurden, die Übergangsdrücke allerdings sehr unterschiedliche Werte aufweisen, kann dies nicht die Erklärung für diesen Umstand sein. Die erhaltenen thermodynamischen Daten lassen den Schluss zu, dass es im Falle der Aktinsuprastrukturen zu einer enthalpischen Stabilisierung via intra- und intermolekularer Protein-Protein-Interaktionen kommt und ebenfalls die Ausbildung eines Hydratationsnetzwerks stark zur Stabilisierung dieser Strukturen beiträgt. Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass Aktinbündel im Vergleich zu Aktinfilamenten etwas instabiler gegenüber einer Temperatur- und Druckerhöhung sind (Abb. 3.21). Eine höhere Sensitivität von Aktinbündeln im Gegensatz zu Filamenten wurde ebenfalls in *in vivo*-Studien nachgewiesen.<sup>[164]</sup> Wie Analysen mittels Transmissionselektronenmikroskopie gezeigt haben, kommt es bei ausreichend hohen Drücken (zwischen ~2-4 kbar) zu einer starken Störung in der Morphologie der Filamentstruktur von F-Aktin und erste Dissoziationsprozesse treten auf. Wird der Druck auf über 4 kbar erhöht, erfolgt die völlige Dissoziation der Filamente. Allerdings kommt es bereits bei niedrigeren Drücken zwischen ~0.5-2 kbar zu ersten Störungen der Filamentstruktur. Dies ist in guter Übereinstimmung mit bisher durchgeführten *in vivo*-Studien zu dieser Thematik, die gezeigt haben, dass eine Reorganisation von Aktinfilamenten durch die Applikation von Drücken von ~1 kbar inhibiert wird. Im Vergleich zu vielen anderen monomeren Proteinen, die bei Drücken zwischen ~4-10 kbar denaturiert werden,<sup>[11,111]</sup> weist G-Aktin eine relativ geringe Druckstabilität auf. Unter Bedingungen wie sie in der Tiefsee vorherrschen, d.h. Temperaturen von etwa 1-4 °C

und Drücke bis zu  $\sim 1$  kbar, wäre G-Aktin kaum in nativem Zustand zu finden (vgl. Abb. 3.21). Die geringe Stabilität ist vermutlich auf die hohe Flexibilität des Proteins zurückzuführen, die bei der strukturellen Reorganisation dieser Monomere bei der G-zu-F-Transformation nötig ist.<sup>[25,78]</sup> Des Weiteren liegt G-Aktin in den meisten Zellen im Komplex mit Aktin-bindenden Proteinen (z.B. Profilin, Thymosin- $\beta 4$ ) vor, um einen Pool an Monomeren bereit zu stellen, sollten diese zur schnellen Reorganisation des Zytoskeletts benötigt werden, wodurch *in vivo* keine hohen Konzentrationen an freiem G-Aktin vorliegen.<sup>[75,200,201]</sup> Es könnte somit sein, dass diese Komplexe zu einer Erhöhung der Proteinstabilität beitragen. Im Gegensatz zu G-Aktin weisen F- und B-Aktin wesentlich höhere Temperatur- und Druckstabilitäten auf. Diese supramolekularen Strukturen sind ebenso stabiler als nicht-filamentöse, amorphe Proteinaggregate, die aufgrund ihrer geringen Packungsdichte und großen interstitiellen Hohlräume bereits bei Drücken von einigen Hundert Bar dissoziieren.<sup>[11,103]</sup> Aktinfilamente und Aktinbündel weisen eine ausreichende Stabilität auf, um den extremen Temperaturen und Drücken, die auf der Erde vorherrschen, standhalten zu können. Die geringere Stabilität von G-Aktin hingegen scheint dafür verantwortlich zu sein, dass bereits bei Drücken von  $\sim 1$  kbar die Filamentassemblierung *in vivo* nicht mehr möglich ist.

### 3.3 Einfluss von Cosolventien auf die Temperatur- und Druckstabilität von Aktinfilamenten

#### 3.3.1 Material und Methoden

##### Materialien und Probenpräparation

$\alpha$ -Aktin, isoliert aus Kaninchen, wurde als Lyophilisat von HYPERMOL (Bielefeld, Deutschland) bezogen. Für FTIR-spektroskopische Messungen wurde zunächst eine G-Aktin Lösung mit einer Konzentration von 27.78 mg / mL in D<sub>2</sub>O oder einer D<sub>2</sub>O-Lösung mit entsprechender Konzentration an TMAO (Trimethylamin-*N*-oxid) oder Harnstoff-<sup>13</sup>C (beide Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) hergestellt, sodass folgende Pufferbedingungen erhalten wurden: 50 mM Tris-Cl, pD 8.6, 10 mM ATP, 2.4 mM Dithiothreitol (DTT), 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM NaN<sub>3</sub>. Zur Induktion der G-zu-F-Transformation wurde F-Puffer (10 ×) hinzugegeben (0.1 M Imidazol, pD 7.8, 10 mM ATP, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl) und die Probe bei einer Temperatur von 25 °C für 2 h inkubiert. Aufgrund der hohen IR-Absorption von Harnstoff im Bereich der Amid-I'-Bande (asymmetrische Streckschwingung der Carbonylgruppe bei ~1618 cm<sup>-1</sup>) wurde <sup>13</sup>C-Harnstoff verwendet, dessen Absorptionsmaximum zu ~1652 cm<sup>-1</sup> verschoben ist. Für DSC-Messungen wurden Aktin-Lösungen mit einer Proteinkonzentration von 1.2 mg / mL und identischen Pufferbedingungen präpariert.

##### Temperatur- und druckabhängige FTIR-Spektroskopie

Temperatur- und druckabhängige FTIR-spektroskopische Messungen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, durchgeführt.

##### Dynamische Differenzkalorimetrie

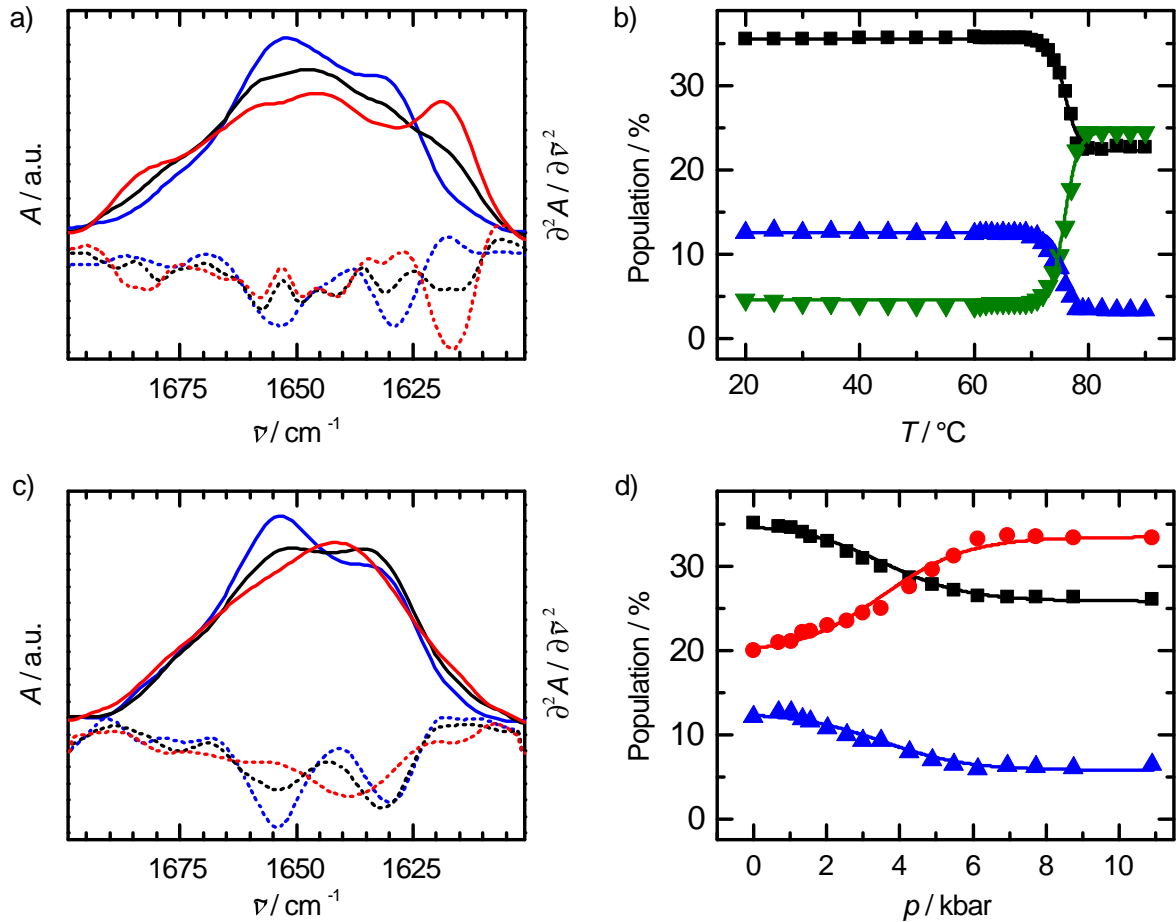
DSC-Messungen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, durchgeführt.



### 3.3.2 Ergebnisse und Diskussion

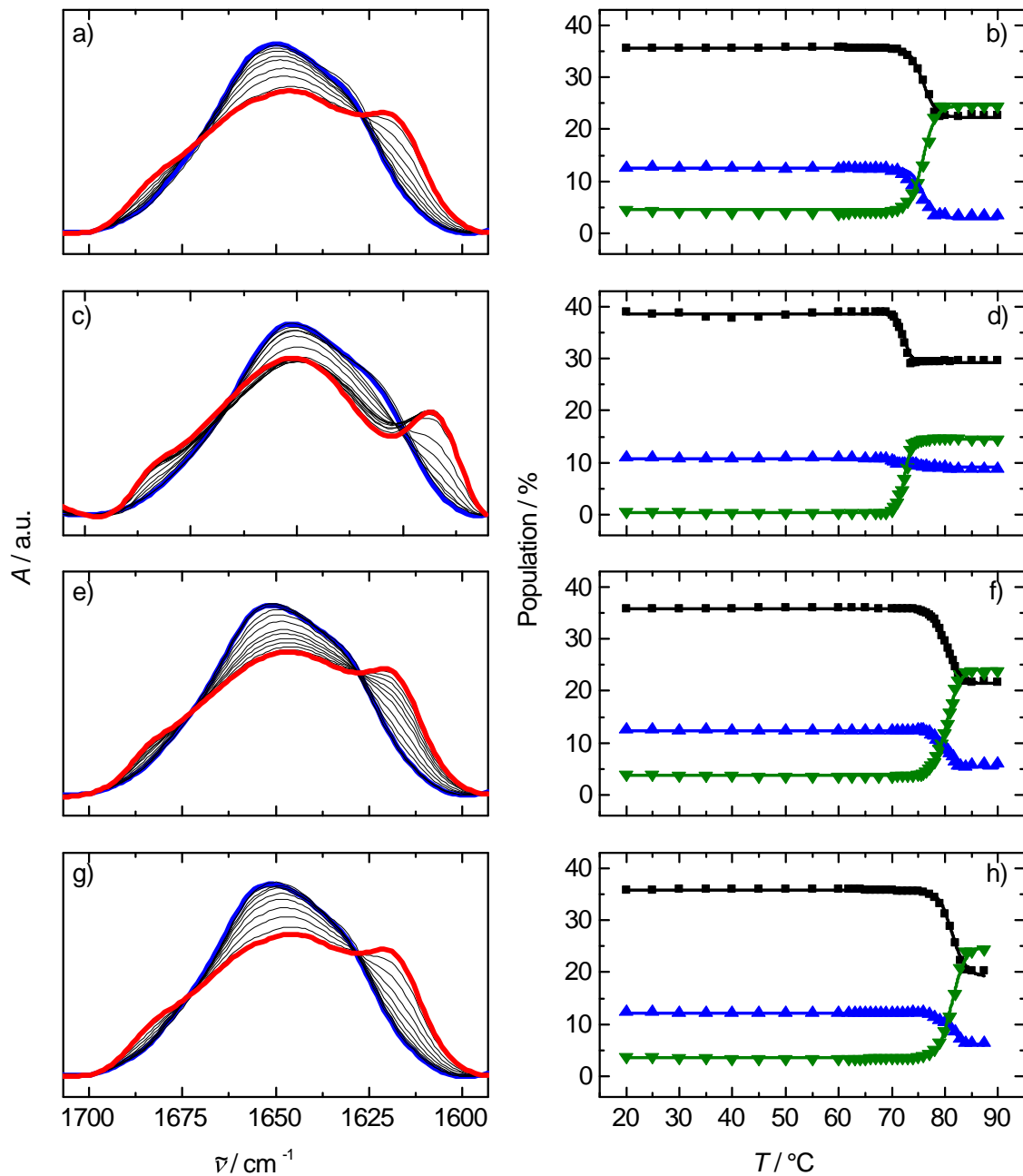
Bevor temperatur- und druckabhängige Veränderungen der Amid-I'-Bande von F-Aktin studiert werden können, wird diese hinsichtlich ihrer Zusammensetzung an Subbanden analysiert, um Informationen über die Sekundärstrukturanteile des Proteins im nativen Zustand zu erhalten. Wie bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben wurde, kann zum einen aufgrund der auftretenden Maxima der entfalteten Amid-I'-Bande und zum anderen auf Basis auftretender Minima in der 2. Ableitung eine Zuordnung von Subbanden erfolgen. Die somit ermittelten Subbanden der Amid-I'-Bande von F-Aktin wurden bereits in Kapitel 3.2.2 und Abbildung 3.8 dargestellt. Zur Auswertung dienen ausschließlich Sekundärstrukturelemente, die sensitiv auf eine Erhöhung von Temperatur oder Druck reagieren und sind in den jeweiligen Diagrammen dargestellt. Die Gegenwart der Cosolventien Harnstoff und TMAO zeigt keinen signifikanten Einfluss bzgl. der Anzahl an Subbanden und deren Position, sodass ausgehend von den bereits ermittelten Subbanden Temperatur- und Druckeffekte in Gegenwart dieser Cosolventien untersucht werden können. Abbildung 3.25 zeigt exemplarisch den Effekt von Temperatur und Druck auf die Sekundärstrukturanteile von F-Aktin. Der native Zustand von Aktinfilamenten weist innerhalb der Amid-I'-Bande des IR-Spektrums, wie bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben, zwei Hauptbanden bei Wellenzahlen von  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha$ -Helices) und  $\sim 1627\text{ cm}^{-1}$  (intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter) auf (Abb. 3.25 a und c). Der thermisch denaturierte Zustand des Proteins hingegen zeigt zwei ausgeprägte Banden bei Wellenzahlen von  $\sim 1616\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1685\text{ cm}^{-1}$  (intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter), die charakteristisch für eine erfolgte Proteinaggregation sind.<sup>[180,202]</sup> Die thermische Denaturierung hat eine stark sinkende Populationen an  $\alpha$ -Helices und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern zur Folge. Der Anteil an intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern steigt drastisch an (für detailliertere Informationen bzgl. des thermisch induzierten Entfaltungsprozesses s. Kapitel 3.2.2).

Eine Erhöhung des Drucks führt zu einer Reduktion der Sekundärstrukturanteile von  $\alpha$ -Helices bei  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$  und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern bei  $\sim 1627\text{ cm}^{-1}$ , der Anteil der Spezies an intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ ), charakterisiert durch schwächere Wasserstoffbrückenbindungen, hingegen steigt (Abb. 3.25 c und d). Vergleicht man die thermisch induzierten Veränderungen der Sekundärstrukturelemente



**Abbildung 3.25:** Temperatur- und druckabhängige FTIR-spektroskopische Analysen von F-Aktin. (a) FSD-Spektrum der Amid-I'-Bande und zugehörige 2. Ableitungen von F-Aktin bei 20  $^{\circ}\text{C}$  (blaue Linie), 76  $^{\circ}\text{C}$  (schwarze Linie) und 90  $^{\circ}\text{C}$  (rote Linie) bei Atmosphärendruck und (c) FSD-Spektrum und zugehörige 2. Ableitungen von F-Aktin bei 20  $^{\circ}\text{C}$  und Drücken von 1 bar (blaue Linie), 5 kbar (schwarze Linie) und 18 kbar (rote Linie). Änderungen ausgewählter Sekundärstrukturelemente in Abhängigkeit der Temperatur (b) und des Drucks (d). An die erhaltenen Daten wurden die BOLTZMANN-Funktionen 3.1 und 3.2 angepasst (als jeweilige Linie dargestellt). ■  $\alpha$ -Helix (1655  $\text{cm}^{-1}$ ), ● intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1635  $\text{cm}^{-1}$ ), ▲ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1627  $\text{cm}^{-1}$ ), ▼ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1616  $\text{cm}^{-1}$ ).

von F-Aktin in Abwesenheit und in Gegenwart von 1 und 2 M TMAO, so ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. Die dargestellten Strukturanteile erfahren mit ansteigender Temperatur im Rahmen des experimentellen Fehlers identische Veränderungen bzgl. ihrer jeweiligen prozentualen Anteile (vgl. Abb. 3.26 b,f,h). In Gegenwart von 0.5 M Harnstoff fallen die Veränderungen bzgl. der Populationen an  $\alpha$ -Helices, intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern und intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter etwas geringer aus (vgl. Abb. 3.26 b und d). Die Analyse der temperaturabhängigen FTIR-spektroskopischen

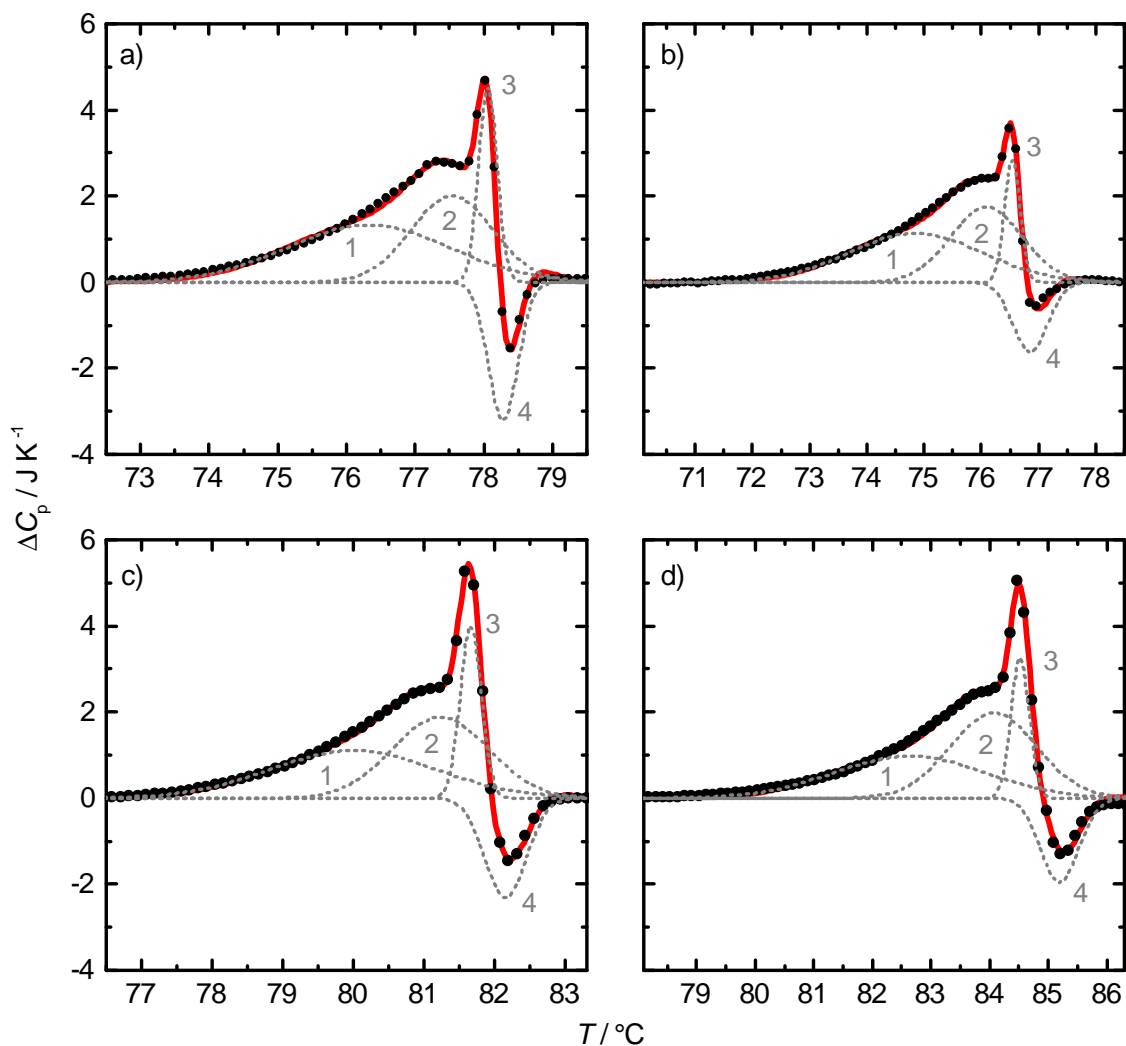


**Abbildung 3.26:** Temperaturabhängige Änderungen der Amid-I'-Bande und ausgewählter Sekundärstrukturelemente von F-Aktin ohne Cosolventien (a,b) und in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff (c,d), 1 M TMAO (e,f) und 2 M TMAO (g,h). Die Amid-I'-Bande des nativen Zustandes ist als blaue Linie und der thermisch denaturierte Zustand als rote Linie hervorgehoben. An die ermittelten Änderungen der Sekundärstrukturanteile wurde die BOLTZMANN-Funktion 3.1 angepasst (als jeweilige Linie dargestellt). ■  $\alpha$ -Helix ( $1655\text{ cm}^{-1}$ ), ▲ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1627\text{ cm}^{-1}$ ), ▼ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1616\text{ cm}^{-1}$ ).

Daten des Denaturierungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin (Abb. 3.26) liefert die in Tabelle 3.2 dargestellten Ergebnisse. Die Übergangstemperatur  $T_m$  des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin ohne die Gegenwart von Cosolventien liegt bei 76.3 °C und die VAN'T HOFF Enthalpie des Übergangs  $\Delta H_{u,vH}^0$  wurde zu 841 kJ mol<sup>-1</sup> bestimmt. Die ermittelten Parameter weichen geringfügig von denen in Kapitel 3.2.2 ab ( $T_m = 75.5$  °C und  $\Delta H_{u,vH}^0 = 821$  kJ mol<sup>-1</sup>), sind allerdings innerhalb des Fehlers identisch. Eine leichte Abweichung könnte auch entstehen, da für diese Studien eine unterschiedliche Charge Aktin verwendet wurde. In Gegenwart von 0.5 M Harnstoff sinkt die  $T_m$  signifikant um 3.7 °C und die VAN'T HOFF Enthalpie des Übergangs wird ebenfalls um ~200 kJ mol<sup>-1</sup> reduziert. Die Reduzierung von  $\Delta H_{u,vH}^0$  deutet darauf hin, dass die Gegenwart von 0.5 M Harnstoff bereits zu einer Abnahme von Bindungen innerhalb der Proteinstruktur geführt hat bzw. ein Einfluss auf den Entfaltungsprozess vorliegt. Wird der Probe hingegen TMAO zugegeben, so steigt die Übergangstemperatur  $T_m$  im Falle einer Konzentration von 1 M um 3.3 °C an und in Gegenwart von 2 M TMAO um 5.8 °C. Die zugehörigen VAN'T HOFF Enthalpien werden innerhalb des experimentellen Fehlers nicht signifikant beeinflusst, sodass TMAO vermutlich keine Auswirkungen auf den eigentlichen Prozess der Entfaltung hat. Da der thermisch induzierte Entfaltungsprozess von F-Aktin irreversibel verläuft, sind die berechneten Größen nicht als Absolutwerte zu sehen, können allerdings zum Vergleich der verschiedenen Cosolvensbedingungen analysiert werden.

**Tabelle 3.2:** Ermittelte Übergangstemperaturen und VAN'T HOFF Enthalpien des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin in Gegenwart von Cosolventien, basierend auf der Analyse der temperaturabhängigen FTIR-spektroskopischen Daten.

Cosolvensbedingungen	$T_m$ / °C	$\Delta H_{u,vH}^0$ / kJ mol <sup>-1</sup>
kein Cosolvens	$76.3 \pm 1.2$	$841 \pm 20$
0.5 M Harnstoff	$72.6 \pm 1.0$	$636 \pm 145$
1 M TMAO	$79.6 \pm 1.1$	$850 \pm 10$
2 M TMAO	$82.1 \pm 1.1$	$823 \pm 49$



**Abbildung 3.27:** DSC-Thermogramme von F-Aktin in Abwesenheit von Cosolventien (a) und in Gegenwart von 0.5 M Harnstoff (b), 1 M TMAO (c) und 2 M TMAO (d). Die erhaltenen Thermogramme wurden mittels FSD-Funktionen analysiert, um etwaige Subbanden zu identifizieren. Die erhaltenen unterliegenden Banden sind als graue Linien dargestellt. Die Funktionsanpassung, basierend auf den ermittelten Banden, ist als rote Linie dargestellt.

Als komplementäre Methode zu den temperaturabhängigen FTIR-Messungen wurden ebenfalls DSC-Messungen an F-Aktin durchgeführt. Abbildung 3.27 zeigt die erhaltenen Thermogramme von F-Aktin (a) und in Gegenwart von 0.5 M Harnstoff (b), 1 M TMAO (c) und 2 M TMAO (d). Die erhaltenen DSC-Daten wurden mittels Fourier-Selbstentfaltungsfunktionen analysiert, um Subbanden und somit Subprozesse zu identifizieren. Wie bereits in Kapitel 3.2.2 erörtert, basiert das erhaltene Thermogramm von F-Aktin auf drei Prozessen und anschließender Aggregation des denaturierten Pro-

teins (Abb. 3.27 Peak 1 - 4). Peak 1 (76.3 °C) und Peak 2 (77.5 °C) sind wahrscheinlich auf eine partielle Entfaltung von Protomeren innerhalb der Filamente zurückzuführen. Diese partielle Entfaltung begründet vermutlich die folgende hochkooperative Dissoziation des Filaments bei ~78.0 °C (Peak 3), die zu dieser scharfen Peakform führt. Der exotherme Peak 4 mit einem Minimum bei einer Temperatur von 78.3 °C ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Aggregation thermisch denaturierter Aktinmonomere zurückzuführen, wie auch bereits durch Levitsky et al. beschrieben wurde.<sup>[189]</sup> Dieses Aggregationsverhalten wird ebenfalls durch die hier vorgestellten FTIR-Daten verifiziert, die einen starken Anstieg an intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter im selben Temperaturintervall aufweisen. Durch die Gegenwart von Cosolventien wird die übergeordnete Peakform und die Anzahl an zugehörigen Subpeaks bzw. Subprozessen des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses nicht verändert (Abb. 3.27). D.h. auch in Gegenwart von Harnstoff oder TMAO handelt es sich bei der thermischen Denaturierung um einen triphasischen Prozess. Im Falle von Harnstoff ist ein kleiner Unterschied bzgl. der Peakhöhe des Peaks 3 zu erkennen, die etwas geringer ausfällt. Allerdings ist es aufgrund der Schärfe des Peaks ebenfalls möglich, dass eventuell ein höherliegender Datenpunkt nicht detektiert wurde. Die Auswertung der erhaltenen Thermogramme des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin in Gegenwart von Harnstoff und TMAO liefert die in Tabelle 3.3 dargestellten Ergebnisse. Prinzipiell führt die Gegenwart von Harnstoff zu einer Absenkung und eine steigende Konzentration an TMAO führt zur Erhöhung der Übergangstemperatur(en), in guter Übereinstimmung mit den erhaltenen FTIR-Daten. Bzgl. der ermittelten kalorimetrischen Enthalpieänderungen  $\Delta H_{u,cal}^0$ , die während des thermisch induzierten Übergangs auftreten, wird ebenfalls ersichtlich, dass Harnstoff diese leicht zu senken scheint, TMAO hingegen keinen signifikanten Einfluss aufweist. Dieser Effekt wurde ebenfalls durch die FTIR-spektroskopischen Analysen bestätigt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Anwesenheit von TMAO sich nicht direkt auf den Entfaltungsmechanismus des Proteins auswirkt, die Gegenwart von Harnstoff hingegen schon. Diese Daten sind in guter Übereinstimmung mit bisherigen Studien und den gefolgerten Theorien bzgl. der Wirkungsmechanismen von Harnstoff und TMAO:<sup>[121]</sup> Die destabilisierende Wirkung von Harnstoff wird basierend auf experimentellen und theoretischen Studien all-

gemein auf eine direkte Interaktion zwischen Osmolyt und Protein zurückgeführt,<sup>[121]</sup> da Harnstoff präferentiell mit Proteinseitenketten und dem Proteinrückgrat wechselwirkt.<sup>[119,120,122–124,203]</sup> Die in Gegenwart von Harnstoff erniedrigte Enthalpieänderung des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin wäre durch einen direkten Wirkungsmechanismus zu erklären. Da die denaturierte Struktur von Proteinen eine höhere Anzahl an Interaktionsstellen der Seitenketten und des Proteinrückgrats aufweist, wird in Gegenwart von Harnstoff das Reaktionsgleichgewicht seitens des entfalteten Ensembles verschoben,<sup>[121]</sup> wodurch ebenfalls die reduzierte Temperaturstabilität des Proteins zu erklären ist. Vermutlich kommt es in Gegenwart von Harnstoff zu einer partiellen Vorentfaltung der Proteinstruktur, die im Falle einer Konzentration von 0.5 M mittels der hier durchgeführten FTIR-Messungen allerdings im Rahmen des experimentellen Fehlers nicht nachweisbar ist. Da höhere Konzentrationen des Osmolyts ebenfalls eine hohe Absorption im Bereich der Amid-I'-Bande aufweisen, wurde die Auswirkung dieser auf die Sekundärstrukturanteile des Proteins nicht weiter studiert.

Im Gegensatz zu Harnstoff ist das allgemeine Verständnis bzgl. der Wirkungsweise von TMAO auf Proteine basierend auf experimentellen und theoretischen Studien ein indirekter Wirkmechanismus, der zu einer Stabilisierung der nativen Konformation von Proteinen führt.<sup>[118,204–206]</sup> Aufgrund der starken Interaktionen zwischen TMAO- und Wassermolekülen führt die Gegenwart von TMAO in wässrigen Lösungen zu einer geordneteren Wasserstruktur, basierend auf der Erhöhung der Wasserstoffbrückenbindungen pro Wassermolekül und einer leichten Erhöhung der Bindungsstärke der Wasserstoffbrückenbindungen.<sup>[205]</sup> TMAO wird präferentiell von der Proteinoberfläche ausgegrenzt, wodurch ein direkter Wirkungsmechanismus ausgeschlossen werden kann.<sup>[204]</sup> Somit konkurriert TMAO nicht mit intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Proteins und dies führt somit nicht zum Aufbrechen des hydrophoben Proteininneren.<sup>[204,207]</sup> Dies wird durch den Vergleich mit den durchgeführten FTIR- und DSC-Messungen deutlich, da eine steigende Konzentration an TMAO keinerlei Auswirkung auf die Enthalpieänderungen des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin aufweist (Tab. 3.2 und 3.3). Der stabilisierende Effekt von TMAO bzgl. des nativen Proteinensembles konnte ebenfalls mittels der durchgeführten temperaturabhängigen FTIR- und DSC-Experimente nachgewiesen werden. In Gegenwart von 1 M

**Tabelle 3.3:** Ermittelte Übergangstemperaturen und kalorimetrische Enthalpien des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin in Gegenwart von Cosolventien, basierend auf der Subbanden-Analyse der erhaltenen DSC-Thermogramme.

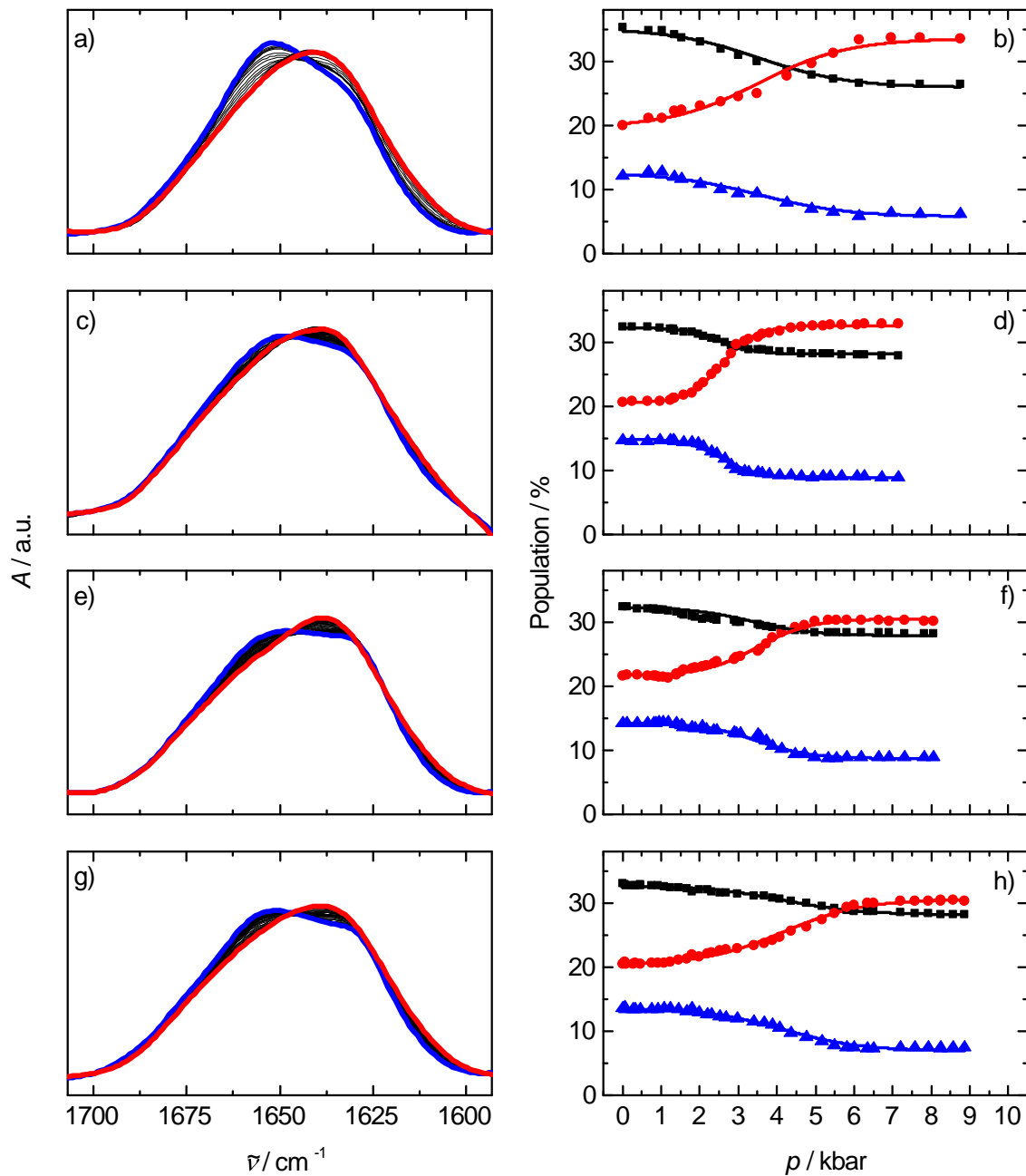
Cosolvensbedingungen	$^iT_{m,1} / T_{m,2} / T_{m,3} / T_{m,4} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{u,cal}^0 / \text{kJ mol}^{-1}$
kein Cosolvens <sup>ii</sup>	76.3 / 77.5 / 78.0 / 78.3 $\pm$ 0.1	1058 $\pm$ 87
0.5 M Harnstoff	74.7 / 76.0 / 76.4 / 76.7 $\pm$ 0.2	936 $\pm$ 45
1 M TMAO	80.4 / 81.4 / 81.8 / 82.3 $\pm$ 0.5	1092 $\pm$ 47
2 M TMAO	82.8 / 84.3 / 84.8 / 85.4 $\pm$ 0.4	1077 $\pm$ 32

<sup>i</sup> Die Zahlen 1, 2, 3, 4 stehen für den jeweiligen Subpeak des zugehörigen Thermogramms. <sup>ii</sup> Die leicht erhöhten Werte der Maxima der jeweiligen Subpeaks, im Vergleich zu den ermittelten Werten in Kapitel 3.2.2, ist durch die Verwendung unterschiedlicher Chargen an Aktin zu erklären.

und 2 M TMAO steigt die Stabilität bzw. die Übergangstemperatur des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin um 3.3 und 5.8  $^\circ\text{C}$  (Tab. 3.2). Es hat sich herausgestellt, dass TMAO die Eigenschaft aufweist mit dem Proteinrückgrat, das im denaturierten Zustand zunehmend exponiert wird, nicht bevorzugt zu interagieren; es handelt sich hierbei um eine solvophobe thermodynamische Triebkraft: den osmophoben Effekt.<sup>[112]</sup> Durch diesen Effekt wird die denaturierte Proteinkonformation destabilisiert bzw. das Gleichgewicht seitens des nativen Zustandes verschoben<sup>[112]</sup>

Es ist bekannt, dass in Zellen von Tiefseeorganismen mit zunehmender Meerestiefe ein linearer Anstieg der Konzentration an TMAO auftritt und diese eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung von Proteinstrukturen und Protein-Ligand-Komplexen gegen hohe hydrostatische Drücke spielt.<sup>[5,6,115]</sup> Yancey et al.<sup>[170]</sup> haben gezeigt, dass die Polymerisationsrate von  $\alpha$ -Aktin aus Skelettmuskeln eines Tiefseefischs (*Coryphaenoides armatus*) bei einem Druck von ~500 bar stark inhibiert wird. Allerdings weisen die Muskelzellen dieses Fisches natürlicher Weise eine erhöhte Konzentration an TMAO von ~250 mM auf. In Gegenwart dieser erhöhten Konzentration an TMAO wurde die inhibierende Wirkung des hydrostatischen Drucks durch den kompatiblen Osmolyt kompensiert, sodass die Polymerisationsrate wieder auf ein Normalmaß anstieg. Im Folgenden werden die Effekte von hohen hydrostatischen Drücken auf die Faltungsstabilität von F-Aktin und die stabilisierenden bzw. destabilisierenden Auswirkungen der Cosolven-





**Abbildung 3.28:** Druckabhängige Änderungen der Amid-I'-Bande und ausgewählter Sekundärstrukturelemente von F-Aktin ohne Cosolventien (a,b) und in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff (c,d), 1 M TMAO (e,f) und 2 M TMAO (g,h). Die Amid-I'-Bande des nativen Zustandes ist als blaue Linie und der druck-denaturierte Zustand als rote Linie hervorgehoben. An die ermittelten Änderungen der Sekundärstrukturanteile wurde die BOLTZMANN-Funktion 3.2 angepasst (als jeweilige Linie dargestellt). ■  $\alpha$ -Helix ( $1655 \text{ cm}^{-1}$ ), ● intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1635 \text{ cm}^{-1}$ ), ▲ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1627 \text{ cm}^{-1}$ ). Die Messungen wurden bei einer konstanten Temperatur von  $20^\circ \text{C}$  durchgeführt.

tien TMAO und Harnstoff untersucht. In Abbildung 3.28 sind die durchgeführten druckabhängigen FTIR-spektroskopischen Analysen von F-Aktin in Abwesenheit von Cosolventien (a,b) und in Gegenwart von 0.5 M Harnstoff (c,d), 1 M TMAO (e,f) und 2 M TMAO (g,h) dargestellt.

Wie bereits erwähnt, weist die native Struktur von F-Aktin zwei maßgebliche Banden auf, die auf hohe Anteile an  $\alpha$ -Helices und intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter zurückzuführen sind. Eine Druckerhöhung hat in Abwesenheit und in Anwesenheit von Harnstoff und TMAO einen identischen Effekt bzgl. der Veränderungen der Sekundärstrukturelemente des Proteins: Populationen an  $\alpha$ -Helices bei  $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$  und intramolekulare  $\beta$ -Faltblättern bei  $\sim 1627\text{ cm}^{-1}$  werden reduziert, der Anteil der Spezies an intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ ), charakterisiert durch schwächere Wasserstoffbrückenbindungen, hingegen steigt (Abb. 3.28 b,d,f,h). Allerdings weisen TMAO und Harnstoff einen unterschiedlichen Effekt bzgl. der ermittelten Übergangsdrücke  $p_u$  des Entfaltungs-/Dissoziationsprozesses von F-Aktin auf (Tab. 3.4). Ohne die Gegenwart von Cosolventien liegt der Übergangsdruck bei 3.5 kbar und die mit dem Entfaltungs-/Dissoziationsprozesses einhergehenden Volumenänderungen betragen  $-21\text{ mL mol}^{-1}$ . Liegen 0.5 M Harnstoff in der Lösung vor, so wird der Übergangsdruck um 1.4 kbar reduziert und die Volumenänderung beträgt  $-64\text{ mL mol}^{-1}$ . Wie bereits bei den temperaturabhängigen Studien nachgewiesen, trägt Harnstoff signifikant zu einer Destabilisierung der Struktur von F-Aktin bei. Dieser Effekt ist auch im Falle der Druckstabilität zu beobachten (3.28 d). Wie bereits erwähnt, ist bekannt, dass Harnstoff direkte Interaktionen mit Proteinseitenketten und dem Proteinrückgrat eingeht. Der entfaltete Zustand von Protein weist eine höhere Anzahl an Interaktionsstellen dieser Art auf als der kompaktere gefaltete Zustand, sodass Harnstoff das Gleichgewicht seitens des denaturierten Zustands verschiebt. Die Volumenänderung  $\Delta V_u$  ist im Vergleich zum Entfaltungs-/Dissoziationsprozesses von F-Aktin ohne die Zugabe von Harnstoff um einen Faktor von  $\sim 3$  erhöht. Allerdings sind Volumenänderungen, die mittels Funktionsanpassung von Formel 3.2 an die experimentellen Daten (Abb. 3.28) erhalten werden mit, einem relativ großen Fehler behaftet ( $\pm \sim 50\%$ ),<sup>[208]</sup> da die Bestimmung des Drucks bei Verwendung der Diamantstempeltechnik relativ ungenau ist ( $\pm 150\text{ bar}$ ). Somit kann im Rahmen des Fehlers nicht sichergestellt werden, dass

**Tabelle 3.4:** Ermittelte Übergangsdrücke und Volumenänderungen des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin in Gegenwart von Cosolventien, basierend auf der Analyse der druckabhängigen FTIR-spektroskopischen Daten.

Cosolvensbedingungen	$p_u$ / kbar	$^i\Delta V_u$ / mL mol <sup>-1</sup>
kein Cosolvens	$3.5 \pm 0.15$	-21
0.5 M Harnstoff	$2.1 \pm 0.15$	-64
1 M TMAO	$3.3 \pm 0.15$	-35
2 M TMAO	$4.2 \pm 0.15$	-23

<sup>i</sup>Basierend auf der Druckbestimmung bei Verwendung der Diamantstempeltechnik mittels BaSO<sub>4</sub> liegt der Fehler von  $\Delta V$  bei  $\pm 50$  %.<sup>[208]</sup>

sich die Anwesenheit von Harnstoff auf eine Volumenänderung auswirkt.

Es ist bekannt, dass der maßgebliche Beitrag der druckinduzierten Volumenänderung von Proteinen beim Übergang des nativen in den entfalteten Zustand Hohlräume innerhalb des Proteins sind, die während der Druckentfaltung mit Wassermolekülen gefüllt werden.<sup>[11,105,106,183,209]</sup> Diese Hohlräume sind allerdings nicht homogen über die Proteinstruktur verteilt, sodass unterschiedliche Drucksensitivitäten in verschiedenen Bereichen des Proteins vorliegen können.<sup>[140]</sup> Ein mögliche Erklärung für eine etwaige erhöhte Volumenänderung des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin in Gegenwart von Harnstoff wäre, dass es zu einer Destabilisierung von Proteinhohlräumen bzw. vollständigen Entfaltung des Proteins kommt, die ohne die Gegenwart von Harnstoff während der Druckentfaltung nicht kollabieren und somit auch die Volumenänderung geringer wäre. Generell wird in der Literatur bisher allerdings kein Einfluss der Konzentration an Harnstoff auf die Volumenänderung während Proteinentfaltungsprozessen beschrieben.<sup>[140]</sup> Der natürliche Osmolyt TMAO weist im Rahmen des Fehlers keinerlei Auswirkung auf die mit dem Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses einhergehenden Volumenänderungen auf. Dies ist vermutlich darin begründet, dass der Wirkmechanismus, wie bereits beschrieben, nicht über direkte Interaktionen des Osmolyts mit dem Protein erfolgt, sondern über eine Veränderung der Wasserstruktur des Umgebungswassers und der Hydratschicht des Proteins, die letztendlich die Stabilisierung der nativen Proteinstruktur verursacht, allerdings keine Auswirkung auf Hohlräume inner-

halb von Proteinen hat. Die Stabilisierung der nativen Proteinstruktur ist in Gegenwart von 1 M TMAO, im Rahmen des Fehlers, noch nicht signifikant ausgeprägt, zeichnet sich allerdings in Anwesenheit von 2 M TMAO deutlich ab, da der Übergangsdruck um 0.7 kbar ansteigt.

### 3.3.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Zellen der meisten Meeresorganismen sind bzgl. des umgebenden Seewassers isoosmotisch. Dies ist allerdings nicht unbedingt in hohen intrazellulären Salzkonzentrationen, sondern vielmehr in hohen Konzentrationen an organischen Osmolyten, wie z.B. Zucker, Polyolen, neutraler Aminosäuren und Methylaminen begründet.<sup>[170]</sup> Des Weiteren haben Analysen der Muskelzellen von Tiefseeorganismen gezeigt, dass der TMAO-Gehalt der Zellen linear mit zunehmender Meerestiefe ansteigt und da der hydrostatische Druck der einzige Umgebungsfaktor ist, der ebenfalls linear mit steigender Meerestiefe ansteigt, wurde die Hypothese aufgestellt TMAO, würde diesem entgegenwirken.<sup>[6]</sup> Wie TMAO gehört auch Harnstoff zur Gruppe der natürlichen Osmolyte, wenngleich diese Substanz keinerlei schützende Wirkung auf Proteinstrukturen aufweist. Harnstoff wird natürlicher Weise bei Säugetieren in Nierenmarkzellen sowie in Zellen von Meeresorganismen wie Haien, Rochen oder Quastenflosslern, akkumuliert.<sup>[5]</sup> *In vivo*-Studien haben bereits gezeigt, dass die Kompression von Zellen bis hin zu mehreren Hundert bar die Zerstörung/Dissoziation von wesentlichen Bestandteilen des Zytoskeletts, wie Mikrotubuli oder Aktinflamenten, zur Folge hat.<sup>[163–167]</sup>

In dieser Studie wurden die Effekte zweier natürlicher Osmolyte hinsichtlich der Temperatur- und Druckstabilität von Aktinflamenten, einem wesentlichen Bestandteil des Zytoskeletts von Zellen, untersucht. Zur Analyse von thermisch und druckinduzierten Änderungen der Struktur von F-Aktin wurden temperatur- und druckabhängige FTIR-Experimente und zur weiteren Analyse von Prozessen, die während der thermischen Entfaltung/Dissoziation von F-Aktin auftreten, wurden DSC-Studien durchgeführt. Temperaturabhängige FTIR-Analysen von F-Aktin haben gezeigt, dass die thermische Denaturierung stark sinkende Populationen an  $\alpha$ -Helices und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern zur Folge hat. Der Anteil an intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern steigt hingegen drastisch an. Diese Veränderungen der Sekundärstrukturelemente wurden so-

wohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit der Osmolyte TMAO oder Harnstoff beobachtet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart von TMAO in der Proteinlösung zu einer signifikanten Steigerung der Stabilität des Proteins gegenüber hohen Temperaturen führt. So stieg die Übergangstemperatur des Entfaltungs-/Dissoziationsprozesses in Gegenwart von 1 und 2 M TMAO um  $\sim 3$  bzw.  $\sim 6$  °C. Hingegen wurden die korrespondierenden Enthalpieänderungen ( $\Delta H_{u,vH}^0$ ,  $\Delta H_{u,cal}^0$ ), im Vergleich zum Entfaltungsverhalten ohne die Anwesenheit von TMAO, nicht signifikant beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass der eigentliche Entfaltungs-/Dissoziationsprozesses von F-Aktin durch den Osmolyt nicht beeinflusst wird. Dies ist vermutlich auf den indirekten Wirkmechanismus der Stabilisierung des Proteins von TMAO zurückzuführen.<sup>[118,204–206]</sup> Es ist bekannt, dass TMAO starke Wechselwirkungen mit Wassermolekülen eingeht und von der Proteinoberfläche präferentiell ausgegrenzt wird.<sup>[204]</sup> Des Weiteren konkurriert TMAO aufgrund seiner geringen Affinität zum Proteinrückgrat nicht mit intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und führt somit nicht zum Aufbrechen des hydrophoben Proteininneren (vgl. Harnstoff).<sup>[204,207]</sup> Des Weiteren wird in Gegenwart von TMAO die Wasserstruktur der Hydratschicht des Proteins verändert, indem die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen erhöht wird.<sup>[205]</sup> In Kombination führen die genannten Effekte zur Verschiebung des Gleichgewichts zwischen nativer und denaturierter Proteinkonformationen seitens des nativen Zustands, der somit stabilisiert wird. Die Analysen der mittels DSC erhaltenen Thermogramme spiegeln ebenfalls den stabilisierenden Effekt von TMAO wider und weisen auf einen triphasischen Entfaltungsprozess mit einer anschließenden Aggregation von thermisch denaturierten Monomeren hin, wie es auch in Abwesenheit von TMAO der Fall ist. Die destabilisierende Wirkung von Harnstoff wird basierend auf experimentellen und theoretischen Studien allgemein auf eine direkte Interaktion zwischen Osmolyt und Protein zurückgeführt, da Harnstoff präferentiell mit Proteinseitenketten und dem Proteinrückgrat wechselwirkt.<sup>[119–124,203]</sup> Der destabilisierende Effekt von Harnstoff konnte auch im Falle von F-Aktin nachgewiesen werden. So wurde aus den erhaltenen FTIR-Daten eine um  $\sim 4$  °C reduzierte Übergangstemperatur ermittelt. Des Weiteren wurden die mit dem thermischen Entfaltungs-/Dissoziationsprozess einhergehenden Enthalpieänderungen ebenfalls verringert. Diese Effekte sind wahrscheinlich

auf eine partielle Destabilisierung / Vorentfaltung der nativen Proteinstruktur zurückzuführen, die durch Interaktionen zwischen Harnstoff und Proteinseitenketten oder dem Proteinerückgrat hervorgerufen werden, allerdings mittels Sekundärstrukturanalysen der Amid-I'-Bande von F-Aktin nicht nachweisbar waren. Allerdings sind prozentuale Änderungen innerhalb von Sekundärstrukturelementen von  $\pm 5\%$  innerhalb des Fehlers dieser Methode anzusehen.<sup>[210]</sup> Da die ermittelten Enthalpieänderungen des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses in Gegenwart von Harnstoff sowohl basierend auf FTIR-Analysen als auch durch DSC-Analysen leicht reduziert waren, könnte dies ein Indiz für eine destabilisierte bzw. partiell entfaltete Proteinkonformation sein, die durch die Gegenwart von Harnstoff induziert wird.

Zur Analyse des Effektes von hohem hydrostatischen Druck auf die Struktur von Aktinfilamenten und dem Einwirken von TMAO und Harnstoff wurden druckabhängige FTIR-Studien bis zu einem Maximaldruck von  $\sim 10$  kbar durchgeführt. Sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit der Cosolventien führt eine Erhöhung des Drucks zu einer Reduktion der Sekundärstrukturanteile von  $\alpha$ -Helices bei  $\sim 1655$   $\text{cm}^{-1}$  und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern bei  $\sim 1627$   $\text{cm}^{-1}$ , der Anteil der Spezies an intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 1635$   $\text{cm}^{-1}$ ), charakterisiert durch schwächere Wasserstoffbrückenbindungen, hingegen steigt. Mittels dieser Methode wurde sowohl der Übergangsdruck des Entfaltungs-/ Dissoziationsprozesses von F-Aktin als auch die damit verbundenen Volumenänderung ermittelt. In Gegenwart von 2 M TMAO ist eine Erhöhung des Übergangsdruck von 700 bar ermittelt worden, während die Volumenänderungen in Gegenwart von 1 und 2 M TMAO im Vergleich zur Probe ohne den Osmolyt nicht verändert wurden und somit im Bereich von  $-21$  bis  $-35$   $\text{mL mol}^{-1}$  liegen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass TMAO über den bereits erwähnten indirekten Mechanismus zur Stabilisierung des Proteins beiträgt, wodurch vorhandene Hohlräume im Proteininneren, die letztendlich maßgeblich für die beim druckinduzierten Entfaltungsprozess auftretenden Volumenänderungen verantwortlich sind, unverändert bleiben. Der dem hydrostatischen Druck entgegenwirkende Effekt des kompatiblen Osmolyts TMAO konnte somit eindeutig nachgewiesen werden. Die Gegenwart von 0.5 M Harnstoff führt zu einer drastischen Destabilisierung von F-Aktin und somit zu einer erhöhten Drucksensitivität. So wird der Übergangsdruck um 1.4 kbar reduziert. Dieser Effekt ist, wie

bereits bei den temperaturabhängigen Studien dargestellt, wahrscheinlich auf eine partielle Vorentfaltung der Proteinstruktur, basierend auf Interaktionen von Harnstoff und Proteinseitenketten und / oder dem Proteinrückgrat, zurückzuführen.

## 4 Assemblierungskinetik von Aktinstrukturen

### 4.1 Einleitung und Zielsetzung

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben, ist sowohl das thermodynamische Gleichgewicht zwischen nativer und entfalteter Proteinkonformation, als auch die chemische Reaktionskinetik intrazellulärer, biomolekularer Systeme signifikant von Temperatur, Druck, natürlichen Osmolyten (TMAO, Harnstoff) und der effektiven Konzentration des betrachteten Proteins bzw. der Reaktanten, die *in vivo* durch hohe Konzentrationen an Makromolekülen beeinflusst wird, abhängig.<sup>[5,6,112,211,212]</sup> Im Falle des kompatiblen Osmolyts TMAO und Harnstoff wurde zudem ein kompensatorischer Effekt bzgl. der Stabilisierung / Destabilisierung von Proteinkonformationen und Assemblierungsprozessen von Proteinen nachgewiesen.<sup>[117,213]</sup> In den folgenden Projekten sollen die Auswirkungen von Temperatur und Druck auf die Polymerisationskinetik von Aktin analysiert werden. Des Weiteren sollen zellähnliche Bedingungen durch die Gegenwart der physiologischen Osmolyte TMAO und Harnstoff dargestellt werden, um die Auswirkungen auf die Assemblierung von Aktinfilamenten bei variierender Temperatur und hohen hydrostatischen Drücken zu studieren. Zudem sollen hohe intrazelluläre Konzentrationen an Makromolekülen durch den Einsatz eines makromolekularen Crowders imitiert werden, um den Polymerisationsprozess unter derartigen Bedingungen studieren zu können.

In Projekt 4.2 - **Cosolvens- und Crowding-Effekte auf die Polymerisationsreaktion von Aktin** wurden die Effekte von kosmotropen und chaotropen Cosolventien (TMAO, Harnstoff) und eines makromolekularen Crowders (Dextran), der ei-



ne hochkonzentrierte makromolekulare Umgebung *in vivo* simulieren soll, auf die Polymerisationskinetik von Aktin studiert. Um Informationen über den Einfluss dieser Substanzen auf die Kinetik der Polymerisationreaktion zu erhalten, wurden transiente Fluoreszenzintensitäts- und -anisotropie-Messungen durchgeführt. Weiterhin zeigen Messungen der Polymerisationsreaktion in Gegenwart von Mischungen beider Osmolyte den bekannten kompensatorischen Effekt von TMAO und Harnstoff auf die Assemblierungskinetik von Aktin. Durch die Anwesenheit des molekularen Crowders Dextran sollten zellähnliche hohe Konzentrationen an Makromolekülen simuliert werden, um den damit verbundenen Effekt auf die Polymerisationskinetik darzustellen.

In Projekt 4.3.3 - **Kombinierte Effekte von Temperatur, Druck und Cosolventien auf die Polymerisationskinetik von Aktin** wurden die Einflüsse von Temperatur und Druck in Gegenwart von Cosolventien auf den Polymerisationsprozess von Aktin studiert. Zur experimentellen Durchführung wurde die Stopped-Flow-Methode in Abhängigkeit von Temperatur und Druck verwendet. Der Polymerisationsprozess von Aktin wurde in beiden Projekten über den Anstieg der Fluoreszenzintensität von Pyren, das kovalent an die Aminosäure Cys374 des Proteins gebunden ist, detektiert. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität basiert auf der Veränderung der Mikroumgebung des Fluorophors, die während der Assemblierung von Aktinflamenten, auftritt und weist eine Proportionalität zur Menge der gebildeten Filamente auf.<sup>[214,215]</sup> Dieser sogenannte *Pyren-Assay* ist eine weitverbreitete Methode zur Detektion der Polymerisationskinetik, der zugrundeliegenden Geschwindigkeitskonstanten des Polymerisationsprozesses oder zur Bestimmung der kritischen Aktinkonzentration.<sup>[61]</sup> Zur Simulation und quantitativen Beschreibung der experimentellen Daten des Polymerisationsprozesses und der Effekte von Temperatur, Druck, der eingesetzten Cosolventien und Crowder, wurde ein integratives, stochastisches Simulationsmodell verwendet werden. Durch die Simulation und quantitative Beschreibung des Polymerisationsprozesses unter genannten variierenden Reaktionsbedingungen konnten die beeinflussten Teilreaktionen der G-zu-F-Transformation identifiziert werden.

## 4.2 Cosolvens- und Crowding-Effekte auf die Polymerisationsreaktion von Aktin

### 4.2.1 Material und Methoden

#### Materialien und Probenpräparation

Pyren-gelabeltes (10 %) und ungelabeltes  $\alpha$ -Aktin aus Kaninchenskelettmuskel, G- und F-Puffer wurden von der Firma HYPERMOL (Bielefeld, Deutschland), Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) und Dextran (durchschnittliche molare Masse = 70 kDa) von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Vor den jeweiligen Experimenten wurde G-Aktin gegen G-Puffer (2 mM Tris-Cl, pH 8.2, 0.4 mM ATP, 0.5 mM DTT, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) dialysiert und anschließend zentrifugiert (100000 *g*, 4 °C, 3 h), um mögliche Proteinaggregate abzutrennen. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mittels der Biuret-Methode bestimmt, bevor dieser in den Experimenten verwendet wurde.

#### Pyren-Assay und Fluoreszenzanisotropie-Messungen

Vor Beginn des jeweiligen Experiments wurde G-Aktin in G-Puffer und der entsprechenden Konzentration an Cosolventien bzw. makromolekularem Crowder inkubiert. Die Polymerisationsreaktion wurde durch Zugabe von F-Puffer (10 mM Imidazol, pH 7.4, 100 mM KCl, 1 mM ATP) induziert. Die Fluoreszenzintensität wurde alle 20 s mittels eines Mikrotiterplatten-Spektrometers (Infinite M200, TECAN) bei 25 °C gemessen. Der Polymerisationsprozess kann über Veränderungen der Fluoreszenzintensität von Pyren ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$ ) detektiert werden (für weitere Einzelheiten bzgl. dieses Nachweises der Polymerisation siehe Referenz:<sup>[217]</sup>). Zur Messung der Fluoreszenzanisotropie wurde die Fluoreszenz von Pyren bei 365 nm angeregt und die Emission bei 412 nm detektiert. Fluoreszenzanisotropie-Messungen wurden in einem Perkin Elmer LS 55 Fluoreszenzspektrometer bei 25 °C durchgeführt.

---

Teile dieser Studie wurden in folgender Referenz veröffentlicht:

Rosin, C., P.H. Schummel, and R. Winter. **2014**. Cosolvent and crowding effects on the polymerization kinetics of actin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17(13): 8330-8337.<sup>[216]</sup>

### Bestimmung der kritischen Konzentration von Aktin

Um den Einfluss der verschiedenen Cosolventien auf die kritische Konzentration von Aktin  $c_c$  zu bestimmen, wurden 15  $\mu\text{M}$  Pyren-gelabeltes Aktin in F-Puffer, in F-Puffer und 1 M TMAO oder in F-Puffer und 1 M Harnstoff polymerisiert. Anschließend wurde aus der Aktinlösung, wie folgt mit F-Puffer und den entsprechenden Konzentrationen an Cosolventien (keine Cosolventien, 1 M TMAO, 1 M Harnstoff), eine Verdünnungsreihe erstellt: 10, 5, 2, 0.5, 0.3, 0.1, 0.05 und 0.02  $\mu\text{M}$  Aktin. Die Fluoreszenzintensitäten ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$ ) dieser Lösungen wurden mittels eines Mikrotiterplatten-Spektrometers (Infinite M200, TECAN) bei 25 °C detektiert, bis keine Veränderungen mehr erkennbar waren bzw. ein Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation eingestellt war. Aus der Auftragung der Fluoreszenzintensität  $I$  gegen die Aktinkonzentration  $c_{\text{Aktin}}$  kann die kritische Konzentration durch den Schnittpunkt der sich ergebenden Geraden unterschiedlicher Steigung bestimmt werden.<sup>[24]</sup>

### Funktionsanpassung an kinetische Daten und Simulation des Polymerisationsprozesses von Aktin

Zur quantitativen Beschreibung der experimentellen Ergebnisse wurden zwei Methoden benutzt. Zum einen wurden die kinetischen Daten mittels eines analytischen Funktionsmodells zur Beschreibung des Polymerisationsprozesses angepasst (s. Gleichung 4.1; mit  $t$  = Zeit,  $I$  = Fluoreszenzintensität,  $I_0$  = Fluoreszenzintensität bei  $t = 0$ ,  $c_{\text{ACF}}$  = Konzentration F-Aktin,  $B$  = Hintergrundfluoreszenz,  $T$  = Verzögerungsphase,  $c_{\text{ACF,max}}$  = maximal gebildete Konzentration an F-Aktin). Hierzu wurde die Software *ActinPyreneFit*<sup>[76]</sup> verwendet. Dieses Funktionsmodell liefert als Ergebnis die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsprozesse der Filamentenden und die Geschwindigkeitskonstante des Nukleationsprozesses. Des Weiteren kann der Wendepunkt (im Folgenden als Halbwertszeit  $t_{1/2}$  definiert) der Funktion bestimmt werden, der ebenfalls als Maß für die Geschwindigkeit der Reaktion fungieren kann.

$$I(t) = (I_0 - B) \frac{c_{\text{ACF}}(t - T)}{c_{\text{ACF,max}}} + B \quad (4.1)$$

Da dieses Modell apparente Assoziations- und Dissoziationsprozesse beschreibt, ist es

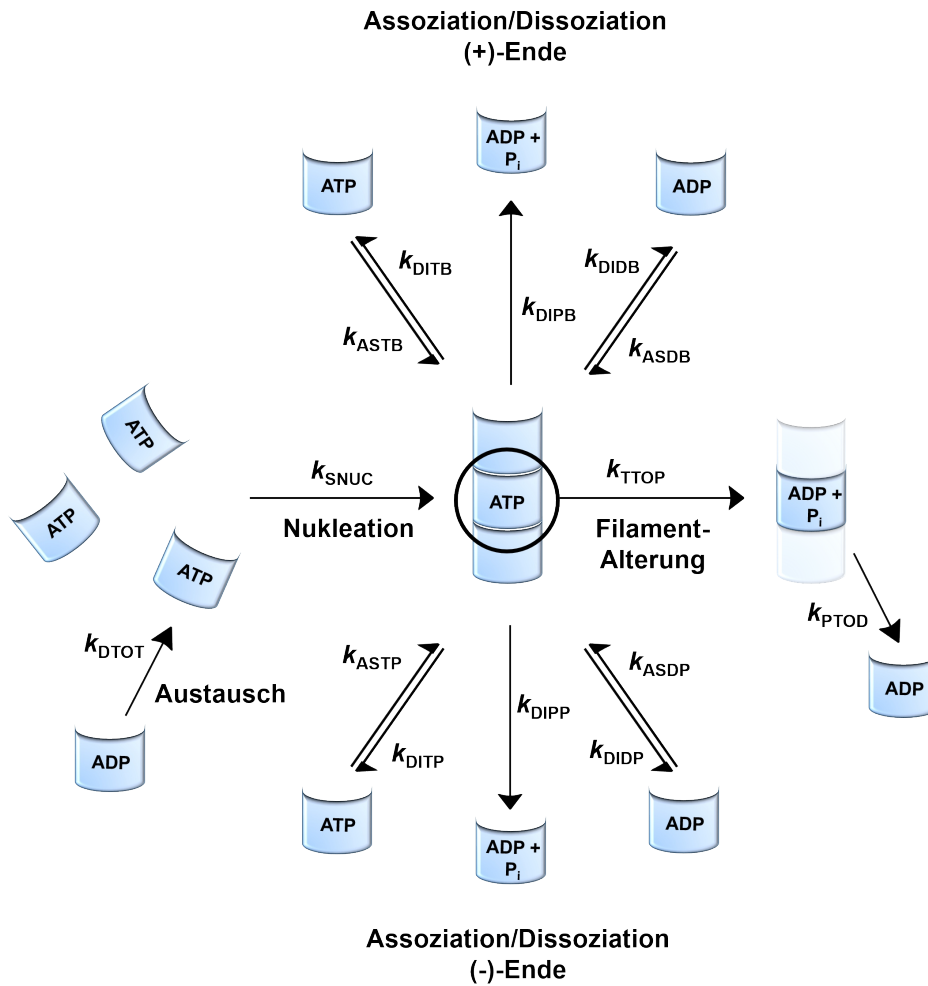
nicht geeignet, um herauszufinden welche(r) Subprozess(e) der Polymerisationsreaktion von Aktin durch Zugabe der genannten Substanzen maßgeblich beeinflusst wird (werden). Zu diesem Zweck wurde zur Beschreibung der Polymerisationsreaktion von Aktin ein Simulationsmodell verwendet, das auf Monte Carlo-Simulationen basiert und die maßgeblichen Reaktionen des Polymerisationsprozesses integriert: *ActinSimChem*.<sup>[76]</sup> Dieses Simulationsmodell berücksichtigt die in Abbildung 4.1 dargestellten Reaktionen, die der Polymerisationsreaktion zu Grunde gelegt werden. Somit ergeben sich für die Konzentrationen von Aktinfilamenten ATF und (+)-Enden FTB die Differentialgleichungen 4.2 und 4.3. Für weitere Details bzgl. des Simulationsprogramms und mechanistischer Modelle für den Polymerisationsprozess von Aktin siehe Referenzen.<sup>[68,76,218]</sup>

$$\begin{aligned} \frac{dc_{ATF}}{dt} = & 3k_{SNUC} \left[ A - c_{ATF} - \frac{k_{DITB}}{k_{ASTB}} \right]^3 \\ & + k_{ASTB}c_{FTB} \left[ A - c_{ATF} - \frac{k_{DITB}}{k_{ASTB}} \right] \\ & + k_{ASTB}c_{FTB} \left[ A - c_{ATF} - \frac{k_{DITP}}{k_{ASTP}} \right] \end{aligned} \quad (4.2)$$

$$\frac{dc_{FTB}}{dt} = 3k_{SNUC} \left[ A - c_{ATF} - \frac{k_{DITB}}{k_{ASTB}} \right]^3 \quad (4.3)$$

Mit ATM = Aktinmonomere mit gebundenem ATP; ATF = F-Aktin-Protomere mit gebundenem ATP; FTB = (+)-Ende beladen mit ATP; FDB = (+)-Ende beladen mit ADP; und folgenden Annahmen:  $c_{ATF} + c_{ATM} = A = \text{konstant}$ ;  $c_{FTB} = c_{FDB}$ .

Bei diesen Simulationen wurde, wie auch bei den anderen Experimenten dieser Studie, eine G-Aktinkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Das Softwarepaket *ActinSimChem* bietet mehrere stochastische Methoden als Basis für die Simulationen an. Da der Gillespie-Algorithmus experimentelle Daten mit den geringsten Abweichungen beschreibt, wurde dieser auch hier verwendet.<sup>[76]</sup> Des Weiteren wurde das „strukturauflösende“ Modell verwendet, das die Polarität der Aktinfilamente berücksichtigt. Zur Simulation der experimentellen Daten wurden zunächst aus der Literatur bekannte Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten verwendet (siehe Tab. 4.1). Drei dieser Konstanten wurden leicht angepasst, um die in dieser Studie erhaltenen Daten der Kinetik von Aktin ohne den



**Abbildung 4.1:** Simulierte Prozesse der Polymerisationsreaktion von Aktin einschließlich der Nukleationsreaktion ( $k_{SNUC}$ ) von ATP-beladenem G-Aktin, der Assoziationsreaktionen von ATP / ADP-gebundenem G-Aktin ( $k_{ASTB}$ ,  $k_{ASDB}$ ) und Dissoziationsreaktionen von ATP / ADP und ADP-Pi-gebundenem G-Aktin ( $k_{DITB}$ ,  $k_{DIPB}$ ,  $k_{DIDB}$ ) am (+)-Ende („barbed end“) des Filaments, der Assoziationsreaktionen von ATP / ADP-gebundenem G-Aktin ( $k_{ASTP}$ ,  $k_{ASDP}$ ) und Dissoziationsreaktionen von ATP / ADP und ADP-Pi-gebundenem G-Aktin ( $k_{DITP}$ ,  $k_{DIPP}$ ,  $k_{DIDP}$ ) am (-)-Ende („pointed end“) des Filaments, der Abbaureaktion von Filamenten („filament aging“) basierend auf der Hydrolyse von ATP-G-Aktin innerhalb des Filaments mit anschließender Freisetzung des Phosphatrestes ( $k_{TTOP}$ ,  $k_{PTOD}$ ) und der Austauschreaktion von ADP gegen ATP in G-Aktin in der Lösung ( $k_{DTOT}$ ).

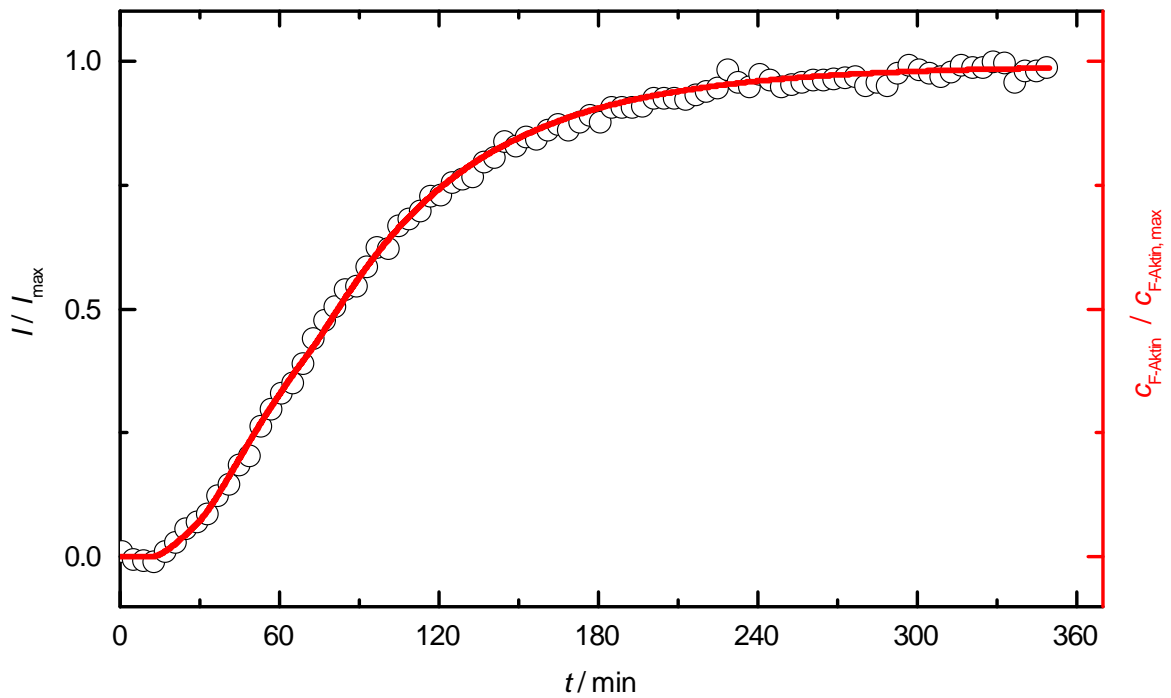
Zusatz von Cosolventien oder Crowder zu beschreiben (s. Tab. 4.1 und Abb. 4.2).

Abbildung 4.2 zeigt die experimentellen Daten des Polymerisationsprozesses von Aktin sowie die Trajektorie der Simulation der Polymerisationsreaktion unter Verwendung der angepassten Geschwindigkeitskonstanten (Tab. 4.1).

Es ist bekannt, dass der Polymerisationsprozess von Aktin nicht gegenüber allen

**Tabelle 4.1:** Geschwindigkeitskonstanten für den Polymerisationsprozess von Aktin

Geschwindigkeitskonstante	Wert	Referenz	Angepasster Wert
$k_{\text{SNUC}}$	$2.3 \times 10^{-11} \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	[218]	$4.1 \times 10^{-11} \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$
$k_{\text{ASTB}}$	$11.5 \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	[64]	$11 \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$
$k_{\text{ASDB}}$	$3.8 \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	[64]	$5 \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$
$k_{\text{ASTP}}$	$1.3 \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{ASDP}}$	$0.16 \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{DITB}}$	$1.4 \text{ s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{DIPB}}$	$1.4 \text{ s}^{-1}$	[64] [219]	identisch
$k_{\text{DIDB}}$	$7.2 \text{ s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{DITB}}$	$0.8 \text{ s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{DIPP}}$	$0.8 \text{ s}^{-1}$	[64] [219]	identisch
$k_{\text{DIDP}}$	$0.27 \text{ s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{TTOP}}$	$0.3 \text{ s}^{-1}$	[220] [67]	identisch
$k_{\text{PTOD}}$	$2.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	[67] [68]	identisch
$k_{\text{DTOT}}$	$20 \text{ s}^{-1}$	[221]	identisch

**Abbildung 4.2:** Experimentelle (normierte Pyren-Fluoreszenzintensität  $I/I_{\text{max}}$ ) und simulierte (Signal normiert auf die maximal gebildete Konzentration an F-Aktin  $c_{\text{F-Aktin}}/c_{\text{F-Aktin,max}}$ ) Polymerisationskinetik von 5  $\mu\text{M}$  Aktin bei 25  $^{\circ}\text{C}$ . Simulationen wurden mit den in Tabelle 4.1 dargestellten Geschwindigkeitskonstanten durchgeführt.

genannten Geschwindigkeitskonstanten eine erhöhte Sensitivität aufweist.<sup>[76]</sup> Die sich maßgeblich auswirkenden Geschwindigkeitskonstanten sind:  $k_{\text{SNUC}}$ ,  $k_{\text{ASTB}}$ ,  $k_{\text{ASDB}}$ ,  $k_{\text{DIPB}}$ ,

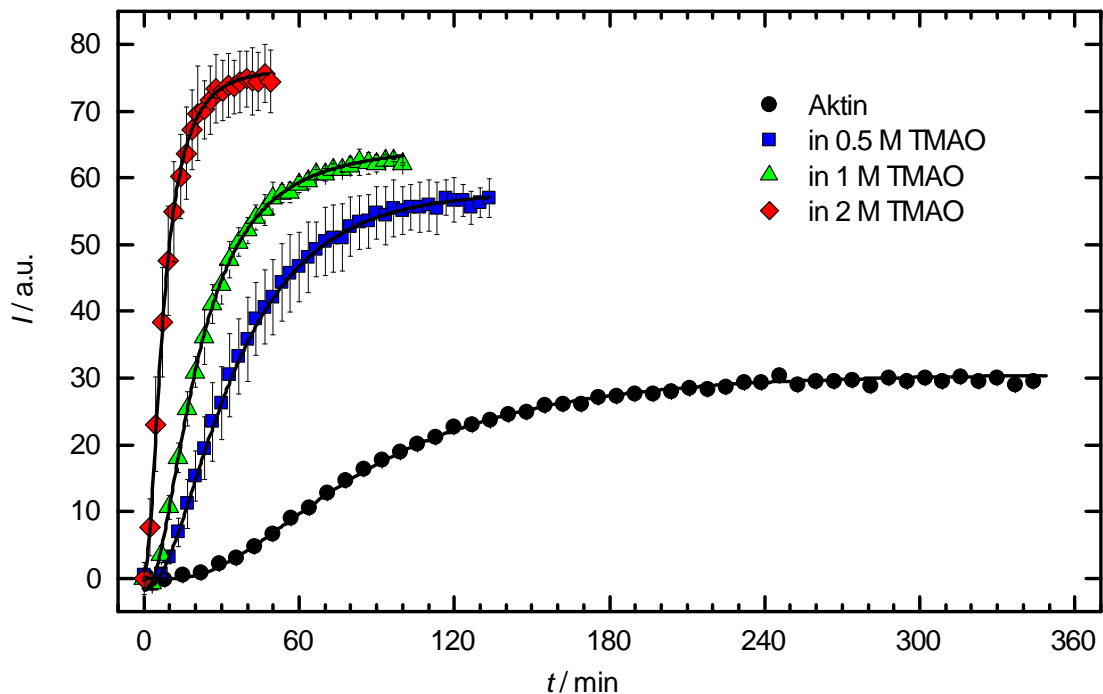
$k_{\text{DIDB}}$ ,  $k_{\text{DITB}}$ , die die Nukleationsreaktion sowie die Assoziations- und Dissoziationsreaktionen von Aktinmonomeren am (+)-Ende des Filaments beschreiben. Die erhöhte Sensitivität ist darin begründet, dass diese Raten um etwa eine Größenordnung höher liegen, als die Analoga am (-)-Ende des Filaments. Um im Folgenden die Einflüsse von Cosolventien und des makromolekularen Crowders auf die Kinetik der Polymerisationsreaktion von G- zu F-Aktin zu analysieren, wurden die Geschwindigkeitskonstanten schrittweise variiert, um die erhaltenen experimentellen Daten zu simulieren.

## 4.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Der erste Schritt der Polymerisationsreaktion von Aktin ist die Assoziation von kleinen, thermodynamisch-instabilen Nuklei. Diese Nukleationsreaktion verläuft relativ langsam und ist durch eine Lag-Phase zu Beginn des Polymerisationsprozesses charakterisiert. Anschließend assemblieren Monomere an den Enden des gebildeten Nukleus und wachsen zu langen, helikalen Filamenten (Elongations-Phase). Der Elongationsprozess ist beendet, wenn die G-Aktinkonzentration in der Lösung auf den Wert der kritischen Konzentration abgesunken ist und somit die Steady-State-Phase erreicht wird, wenn die Assoziationsprozesse am (+)-Ende gleich schnell ablaufen wie die Dissoziationsprozesse am (-)-Ende, wodurch kein Netto-Wachstum des Filaments mehr erfolgt. Der Polymerisationsprozess von 5  $\mu\text{M}$  G-Aktin wurde mittels des Anstiegs der Fluoreszenzintensität des kovalent an Cystein374 des Proteins gebundenen Fluorophors Pyren verfolgt. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität ist auf Veränderungen der Mikroumgebung um den Fluorophor zurückzuführen, die während der G-zu-F-Transformation auftreten.<sup>[214,215]</sup> Aus diesem Grund ist der *Pyren-Assay* eine weitverbreitete Methode, um z.B. die Polymerisationskinetik zu detektieren, zugrundeliegende Geschwindigkeitskonstanten oder die kritische Konzentration zu bestimmen.<sup>[61]</sup> Wird der Polymerisationsprozess, wie beschrieben mittels *Pyren-Assay* verfolgt, so wird zumeist ein sigmoidaler Kurvenverlauf beobachtet. Im Folgenden sind die Ergebnisse dargestellt und diskutiert, die erhalten wurden, wenn Aktin in Gegenwart von Osmolyten (TMAO, Harnstoff) oder makromolekularen Crowdern (Dextran) polymerisiert.

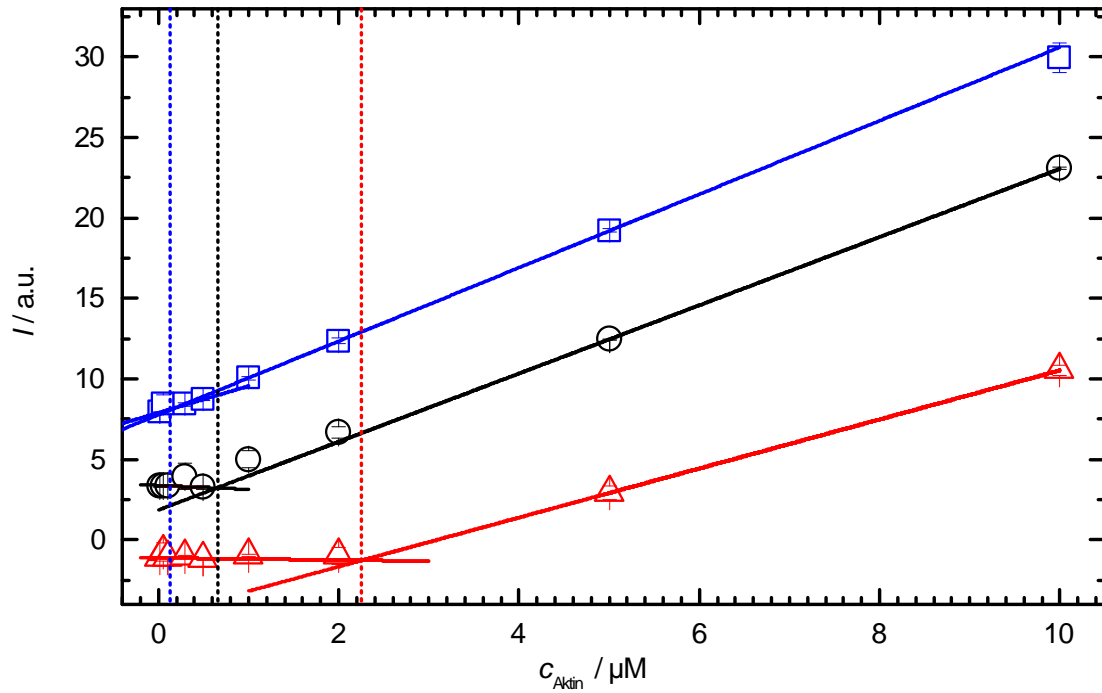
### TMAO beschleunigt die Polymerisationsreaktion von Aktin durch den Einfluss auf die Nukleationsreaktion und die kritische Konzentration

Um den Effekt von TMAO auf die Polymerisationskinetik von Aktin zu studieren, wurden Lösungen mit 0,5, 1 und 2 M TMAO verwendet. Abbildung 4.3 zeigt den Effekt von TMAO auf den Verlauf der Kinetik der Polymerisationsreaktion. Verläuft der Polymerisationsprozess ohne die Zugabe von TMAO, so wird die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  zu 82 min bestimmt. Nach etwa 240 min wird die Steady-State-Phase erreicht. Polymerisiert Aktin in Gegenwart von 0,5, 1 oder 2 M TMAO, führt dies zu einer drastischen Beschleunigung des gesamten Polymerisationsprozesses (Abb. 4.3). Es ist leicht ersichtlich, dass mit steigender TMAO-Konzentration in der Lösung die Nukleationsphase verkürzt, die Steigung der Elongations-Phase und der Plateauwert der Steady-State-Phase erhöht werden. Die Halbwertszeiten der Reaktion werden ebenfalls mit steigender TMAO-Konzentration reduziert. In Gegenwart von 0,5 M TMAO ist  $t_{1/2}$  im Vergleich zur Reaktion ohne TMAO um 50 min reduziert, in 1 M TMAO um 62 min und in Gegenwart



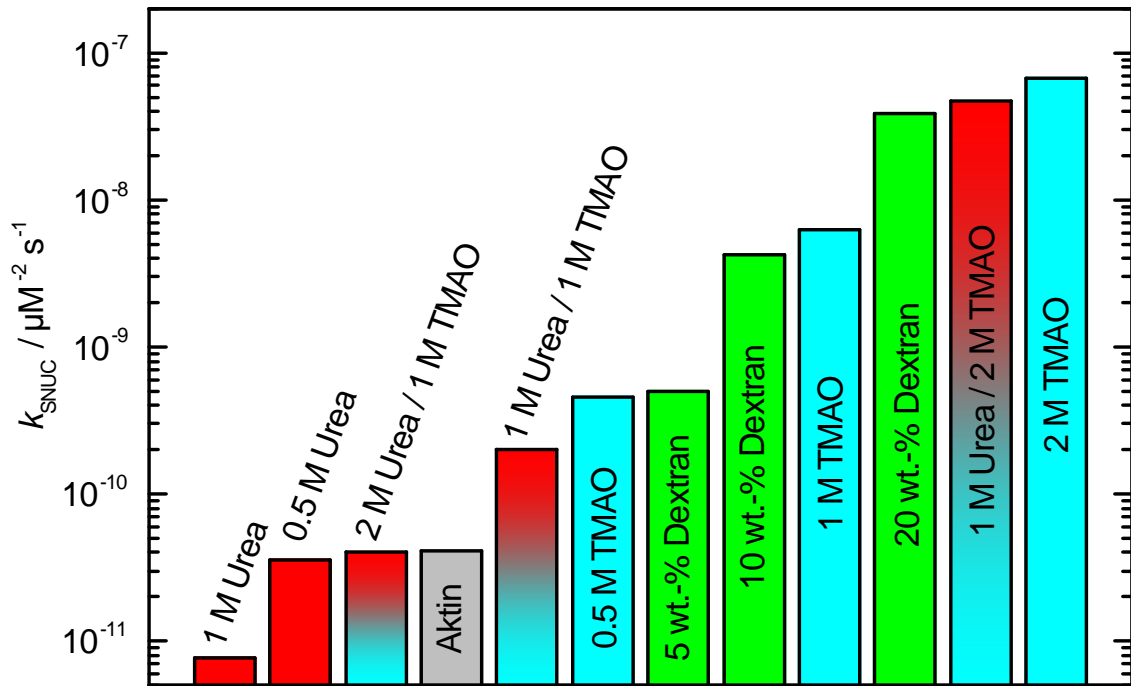
**Abbildung 4.3:** Pyren-Fluoreszenzdaten der Polymerisationsreaktion von 5  $\mu$ M Aktin in verschiedenen Konzentrationen TMAO und Funktionsanpassungen mittels des analytischen Modells (schwarze Linien) bei 25 °C.





**Abbildung 4.4:** Bestimmung der kritischen Konzentration  $c_c$  von Aktin ohne die Zugabe von Osmolyten (schwarze Kreise), in Anwesenheit von 1 M TMAO (blaue Quadrate) und 1 M Harnstoff (rote Dreiecke). 15  $\mu\text{M}$  G-Aktin wurden in Puffern mit entsprechendem Osmolytgehalt polymerisiert. Nach beendeter Polymerisation wurden die Lösungen mit den zugehörigen Puffern verdünnt zu: 10, 5, 2, 0,5, 0,3, 0,1, 0,05 und 0,02  $\mu\text{M}$  Aktin. Die sich ergebenden Geraden unterschiedlicher Steigung wurden an die experimentellen Daten angepasst und die Schnittpunkte dieser erlauben die Bestimmung der  $c_c$  in Abhängigkeit des jeweiligen Osmolytes.

von 2 M TMAO wird  $t_{1/2}$  75 min eher erreicht. Auch die Steady-State-Phase wird im Vergleich zu Lösungen ohne den Osmolyt mit steigender TMAO-Konzentration schneller erreicht. Wie bereits erwähnt, steigt der Wert des Plateaus (Steady-State-Phase) mit steigender Konzentration an TMAO. Dies ist vermutlich auf eine erhöhte Anzahl oder Länge an Aktinfilamenten zurückzuführen und begründet in einer reduzierten kritischen Konzentration  $c_c$  der Filamentenden, wenn TMAO der Lösung hinzugefügt wird. Um dies nachzuweisen, wurde die  $c_c$  von Aktin ohne und in Gegenwart von 1 M TMAO bestimmt (siehe Abb. 4.4). Polymerisiert Aktin in Abwesenheit von Osmolyten unter den hier verwendeten Pufferbedingungen, wurde die  $c_c$  zu 0,66  $\mu\text{M}$  bestimmt, in guter Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten.<sup>[64,222]</sup> Wird die Polymerisationsreaktion unter genannten Pufferbedingungen und 1 M TMAO durchgeführt, so ergibt sich eine  $c_c$  von 0,13  $\mu\text{M}$ , was vermutlich an einer erhöhten Assoziationsgeschwindigkeits-



**Abbildung 4.5:** Geschwindigkeitskonstanten des Nukleationsprozesses  $k_{\text{SNUC}}$  von  $5 \mu\text{M}$  Aktin in Lösungen mit verschiedenen Osmolyten und Osmolytkonzentrationen bei  $25^\circ\text{C}$ .

konstanten liegt. Allerdings muss hier der experimentelle Fehler bei diesen geringen Proteinkonzentrationen berücksichtigt werden, sodass kein exakter Wert angegeben werden kann, in Relation allerdings reduziert zu sein scheint. Um herauszufinden, ob TMAO, Harnstoff und Dextran einen Effekt auf den Nukleationsprozess ausüben, wurde die Geschwindigkeitskonstante des Nukleationsprozesses  $k_{\text{SNUC}}$  bestimmt, indem das mathematische Modell, dargestellt in Formel 4.1, an die kinetischen Daten angepasst wurde. Eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse gibt Abbildung 4.5. Die Nukleationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{\text{SNUC}}$  des Polymerisationsprozesses von  $5 \mu\text{M}$  Aktin wurde zu  $4.1 \times 10^{-11} \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$  bestimmt. Ein ähnlicher Wert von  $2.3 \times 10^{-11} \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$  wurde von Samarin et al. gefunden.<sup>[218]</sup> In Gegenwart von  $0.5 \text{ M}$  TMAO steigt  $k_{\text{SNUC}}$  bereits um eine Größenordnung zu  $4.6 \times 10^{-10} \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Die Zugabe von  $1 \text{ M}$  und  $2 \text{ M}$  TMAO führt zu einem weiteren drastischen Anstieg der Nukleationsrate um jeweils eine Größenordnung zu  $6.24 \times 10^{-9}$  und  $6.73 \times 10^{-8} \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

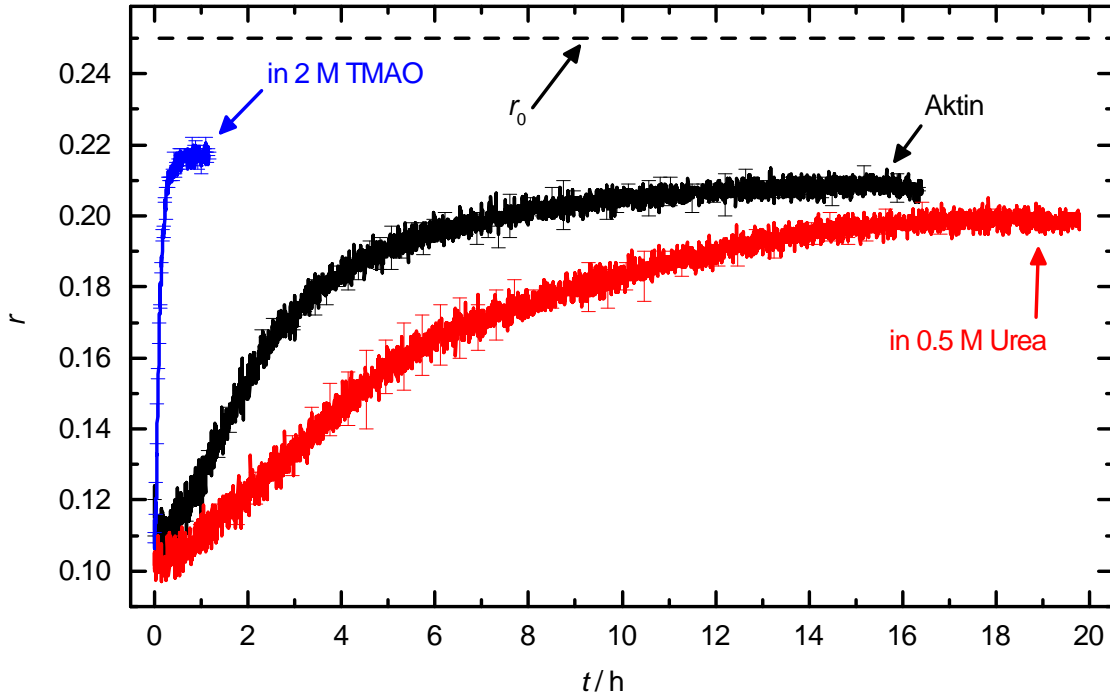
Mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen konnten ähnliche Effekte bei Zugabe von TMAO beobachtet werden. Aufgrund der Abhängigkeit von der Rotationsdiffusions-

konstante des gemessenen Partikels ist die statische Fluoreszenzanisotropie  $r$ , ein Parameter, der Aussagen über die Größe von Molekülen erlaubt (Gleichung 4.4):

$$r^{-1} = r_0^{-1} \left[ 1 + \frac{k_B T \tau}{\eta V_h} \right] \quad (4.4)$$

mit  $r_0$  = intrinsischer Anteil der Anisotropie,  $\eta$  = Mikroviskosität,  $\tau$  = Fluoreszenzlebenszeit des angeregten Zustandes des Fluorophors,  $V_h$  = hydrodynamisches Volumen des Partikels.<sup>[223]</sup>

Abbildung 4.6 zeigt transiente Anisotropie-Messungen der G-zu-F-Transformation von Aktin und in Anwesenheit von TMAO oder Harnstoff. Die Zugabe von 2 M TMAO beschleunigt die Reaktion drastisch, so wird  $t_{1/2}$  um 104 min verringert, verglichen mit der Reaktion ohne Anwesenheit von TMAO in der Lösung. Die Anisotropie  $r$  kann unter der Näherung, dass der Wert der Mikroviskosität identisch zu dem des Wassers ist ( $8.9 \times 10^{-4} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei 25 °C), berechnet werden. Der intrinsische Anteil der Anisotropie wurde mittels Pyren-gelabelten Proteinen bestimmt und beträgt  $r_0 = 0.25$ .<sup>[223]</sup> Der ko-



**Abbildung 4.6:** Transiente Fluoreszenzanisotropie-Daten der Polymerisationsreaktion von 5  $\mu\text{M}$  Aktin in Anwesenheit von 2 M TMAO, 0.5 M Harnstoff und ohne Zugabe von Osmolyten bei 25 °C.

valent an das Protein gebundene Fluorophor Pyren weist zwei Fluoreszenzlebenszeiten auf ( $\tau_1 = 24.5 \text{ ns}$  ( $\alpha_1 = 0.76$ ) und  $\tau_2 = 100.2 \text{ ns}$  ( $\alpha_1 = 0.24$ )),<sup>[223]</sup> aus denen mit Gleichung 4.5 die gemittelte Fluoreszenzlebenszeit zu  $67.2 \text{ ns}$  bestimmt wurde.

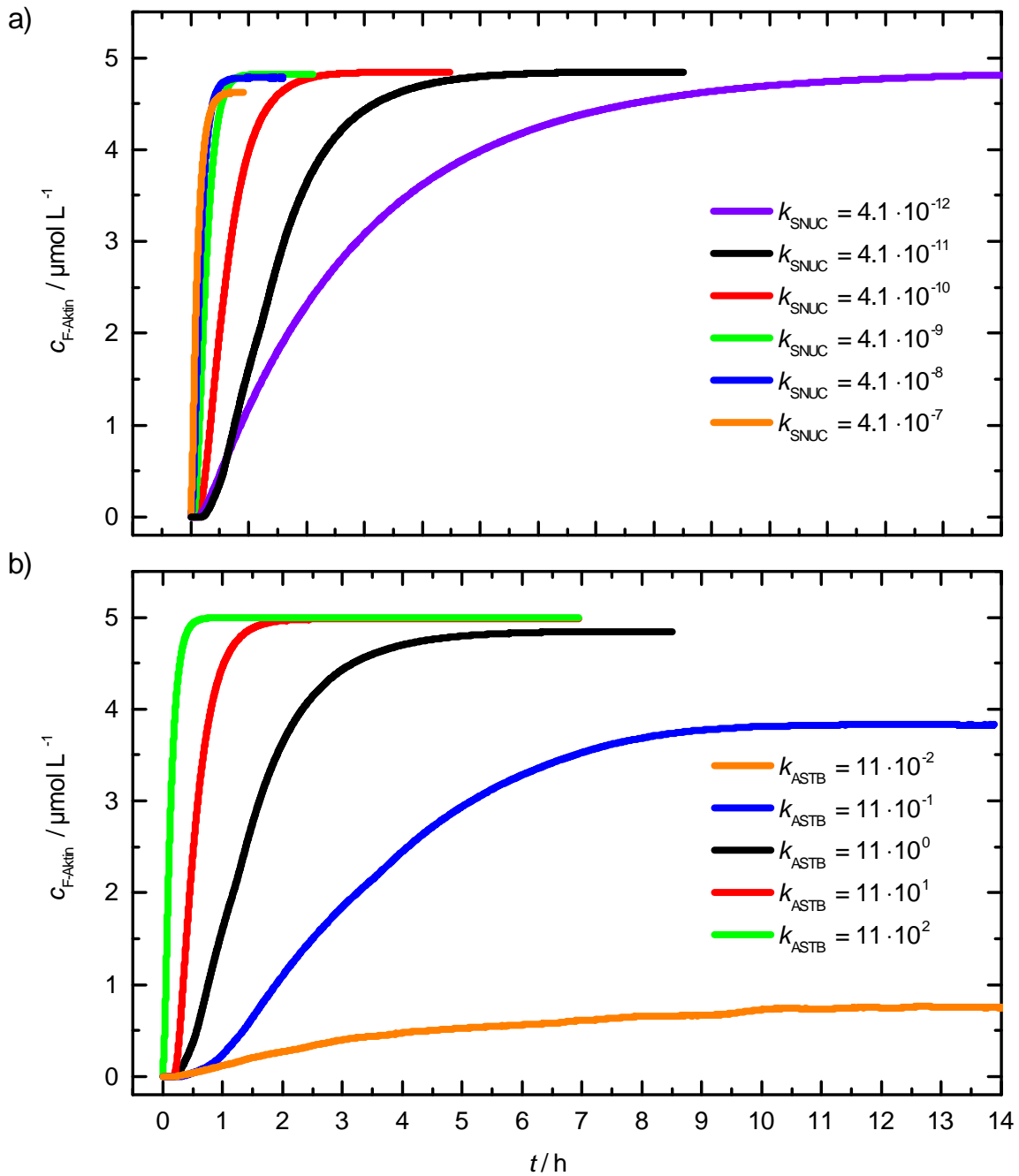
$$\bar{\tau} = \frac{\alpha_1 \tau_1^2 + \alpha_2 \tau_2^2}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2} \quad (4.5)$$

Mit  $\alpha_i$  = Amplitude der Fluoreszenzlebenszeit  $i$ . Für ein kugelförmiges Molekül kann das hydrodynamische Volumen  $V_h$  unter Verwendung der Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 4.6) berechnet werden.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (4.6)$$

Mit  $D$  = Diffusionskoeffizient,  $k_B$  = Boltzmannkonstante,  $\eta$  = Viskosität,  $R_h$  = hydrodynamischer Radius des Partikels. Unter Einbeziehung des Diffusionskoeffizienten,  $D = 7.03 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,<sup>[224]</sup> beträgt  $V_h$  für G-Aktin  $178 \text{ nm}^3$  und  $r = 0.091$ . Der Wert der Anisotropie  $r$  stimmt gut mit dem experimentell bestimmten Wert von G-Aktin,  $r = 0.111 \pm 0.006$ , überein, der aus Fluoreszenzanisotropie-Messungen ermittelt wurde bevor die Polymerisationsreaktion durch Zugabe von KCl induziert wurde. Aufgrund der hohen Polydispersität bzgl. der Größe der Aktinspezies während des Polymerisationsprozesses kann eine solche Analyse sinnvollerweise nur für G-Aktin als monodisperses System durchgeführt werden. Nach abgeschlossener Polymerisation ergibt sich ohne die Zugabe von TMAO ein Plateauwert der Anisotropie  $r$  von  $0.207 \pm 0.001$  und in Anwesenheit von  $2 \text{ M}$  TMAO beträgt  $r = 0.217 \pm 0.001$ . Der höhere Wert in Gegenwart von TMAO ist somit vermutlich auf Aktin-Filamente mit einer erhöhten mittleren Länge zurückzuführen, wie bereits durch die komplementären Fluoreszenzintensitätsmessungen aufgezeigt.

Um die experimentell gefundenen Effekte von TMAO weiter zu analysieren, wurde der Polymerisationsprozess mittels der Software *ActinSimChem* simuliert. Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, zeigt die Polymerisationskinetik nur für wenige der in Abbildung 4.1 dargestellten Reaktionen und zugehörigen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten, die dem Polymerisationsprozess zugrundeliegen, ein sensitives Verhalten.



**Abbildung 4.7:** (a) Simulationsexperiment der Polymerisationskinetik von 5  $\mu\text{M}$  Aktin mit über sechs Größenordnungen variierten Nukleationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{\text{SNUC}}$  (in  $\mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Alle weiteren Reaktionsparameter wurden konstant gehalten (siehe Tab. 4.1). Die simulierte Kurve, die den experimentell verfolgten Polymerisationsprozess bei 25 °C (Abb. 4.2) beschreibt, ist in schwarz dargestellt. (b) Simulationsexperiment der Polymerisationskinetik von 5  $\mu\text{M}$  Aktin mit über fünf Größenordnungen variierten Assoziationsgeschwindigkeitskonstante des (+)-Endes  $k_{\text{ASTB}}$  (in  $\mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Alle weiteren Reaktionsparameter wurden konstant gehalten (siehe Tab. 4.1). Die simulierte Kurve, die den experimentell verfolgten Polymerisationsprozess bei 25 °C (Abb. 4.2) beschreibt, ist in schwarz dargestellt.

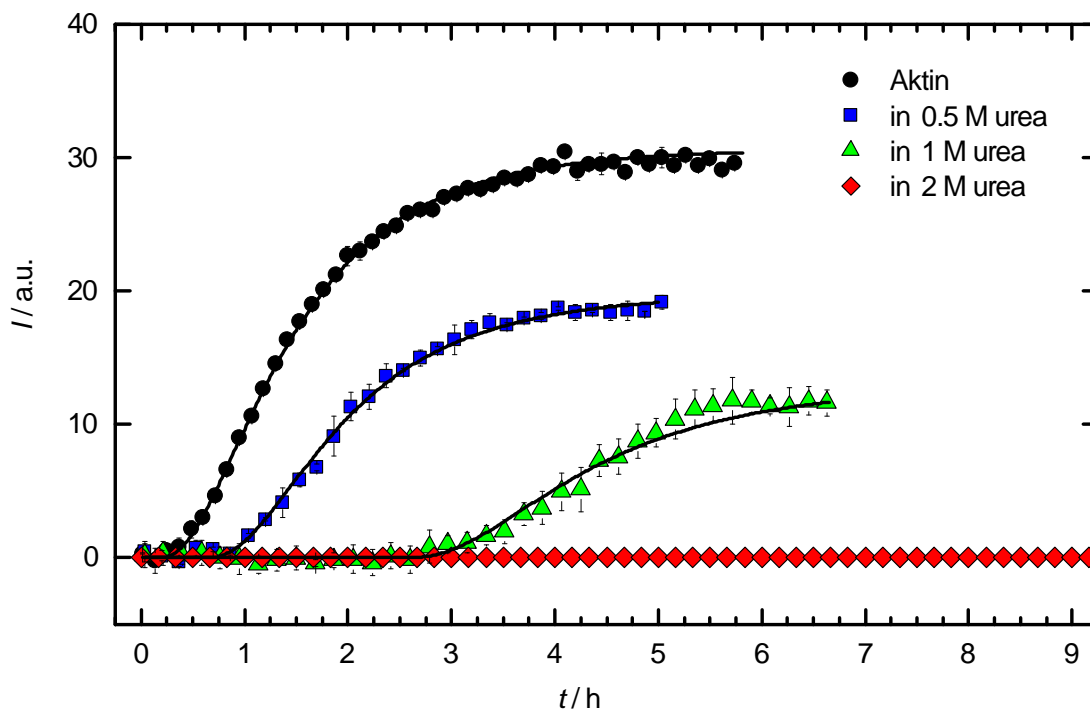
Die Geschwindigkeitskonstanten, die maßgeblich die Kinetik des Polymerisationsprozesses beeinflussen, sind zum einen die Assoziations- und Dissoziationsraten,  $k_{\text{ASTB}}$  und  $k_{\text{DITB}}$ , von Aktinmonomeren am (+)-Ende des Filaments und zum anderen die Nukleationsreaktion, beschrieben durch  $k_{\text{SNUC}}$ . Ausgehend von den in Tabelle 4.1 dargestellten Geschwindigkeitskonstanten wurde die Geschwindigkeitskonstante des Nukleationsprozesses  $k_{\text{SNUC}}$  (Abb. 4.7a) und der Assoziation von monomerem Aktin an das (+)-Ende des Filaments  $k_{\text{ASTB}}$  (Abb. 4.7 b), in unabhängigen Simulationsexperimenten, schrittweise über mehrere Größenordnungen variiert. Wie in Abbildung 4.7 a und b zu erkennen ist, können die experimentell gefundenen, durch TMAO verursachten Effekte durch eine Erhöhung von  $k_{\text{SNUC}}$  und/oder  $k_{\text{ASTB}}$  simuliert werden. Die Erhöhung von  $k_{\text{ASTB}}$  manifestiert sich direkt in einer Herabsetzung der kritischen Konzentration des (+)-Endes, da  $c_c = k_{\text{DITB}}/k_{\text{ASTB}}$  und somit steigt die Länge oder Anzahl an Aktin-Filamenten. Ebenso kann die drastische Reduzierung der Lag-Phase und die beschleunigte Elongations-Phase durch Erhöhung von  $k_{\text{SNUC}}$  oder  $k_{\text{ASTB}}$  erklärt werden. Durch die mathematische Kopplung der beiden Geschwindigkeitskonstanten kann allerdings der Effekt der reduzierten Lag-Phase und der beschleunigten Elongationsphase nicht eindeutig zugeordnet werden, da eine wechselseitige Beziehung basierend auf dem zugrundeliegenden mathematischen Modell besteht (Gleichung 4.2). Die Absenkung der kritischen Konzentration und der damit einhergehende Anstieg der Länge bzw. Anzahl der gebildeten Aktin-Filamente ist vermutlich auf den Anstieg der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{\text{ASTB}}$  des (+)-Endes zurückzuführen.

TMAO ist ein natürlicher Osmolyt, der insbesondere in Organismen gefunden wird, die äußerem Stress ausgesetzt sind. Hier wirkt TMAO stabilisierend auf die Struktur von Proteinen und wird dementsprechend auch als „chemisches Chaperon“ bezeichnet.<sup>[114,121]</sup> Es ist ebenfalls bekannt, dass TMAO aufgrund seiner starken Interaktionen mit Wassermolekülen, in der Lage ist, oligomere und polymere Proteine entropisch zu stabilisieren („preferential hydration effect“).<sup>[116,118]</sup> Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass TMAO auf den Nukleationsprozess wirkt, indem es das Monomer  $\rightleftharpoons$  Oligomer-Equilibrium auf die Seite der oligomeren Spezies (Nuklei) verschiebt, da diese stabilisiert werden. Dieser Effekt resultiert in einer beschleunigten Nukleationsreaktion, die spektroskopisch durch eine reduzierte Lag-Phase nachweisbar ist. Dieser Effekt führt

ebenfalls zu einer Erhöhung der Steigung der Elongationsphase und wirkt sich auf die kritische Konzentration von Aktin aus, da die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten an den Filamentenden erhöht werden, wodurch längere Filamente entstehen, wie in dieser Studie durch Fluoreszenzintensitäts- und -anisotropie-Experimente dargestellt.

### Harnstoff verringert die Nukleations- und Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten des Polymerisationsprozesses und erhöht die kritische Konzentration

Zur Analyse des Einflusses von Harnstoff, als repräsentatives chaotropes Cosolvents, auf den Polymerisationsprozess von Aktin wurden Lösungen mit 0.5, 1 und 2 M Harnstoff hergestellt. Polymerisiert Aktin in Gegenwart von Harnstoff ist ein drastischer Anstieg der Lag-Phase und der Halbwertszeit der Reaktion zu erkennen (Abb. 4.8). Bei Zugabe von 0.5 M Harnstoff erhöht sich die Halbwertszeit um 37 min und in Lösungen mit 1 M Harnstoff um 190 min (Abb. 4.9). Im Falle von 2 M Harnstoff konnte der Polymerisationsprozess innerhalb des gemessenen Zeitintervalls von 16 h nicht mehr detektiert werden. Es ist ebenso ersichtlich, dass mit steigender Konzentration an

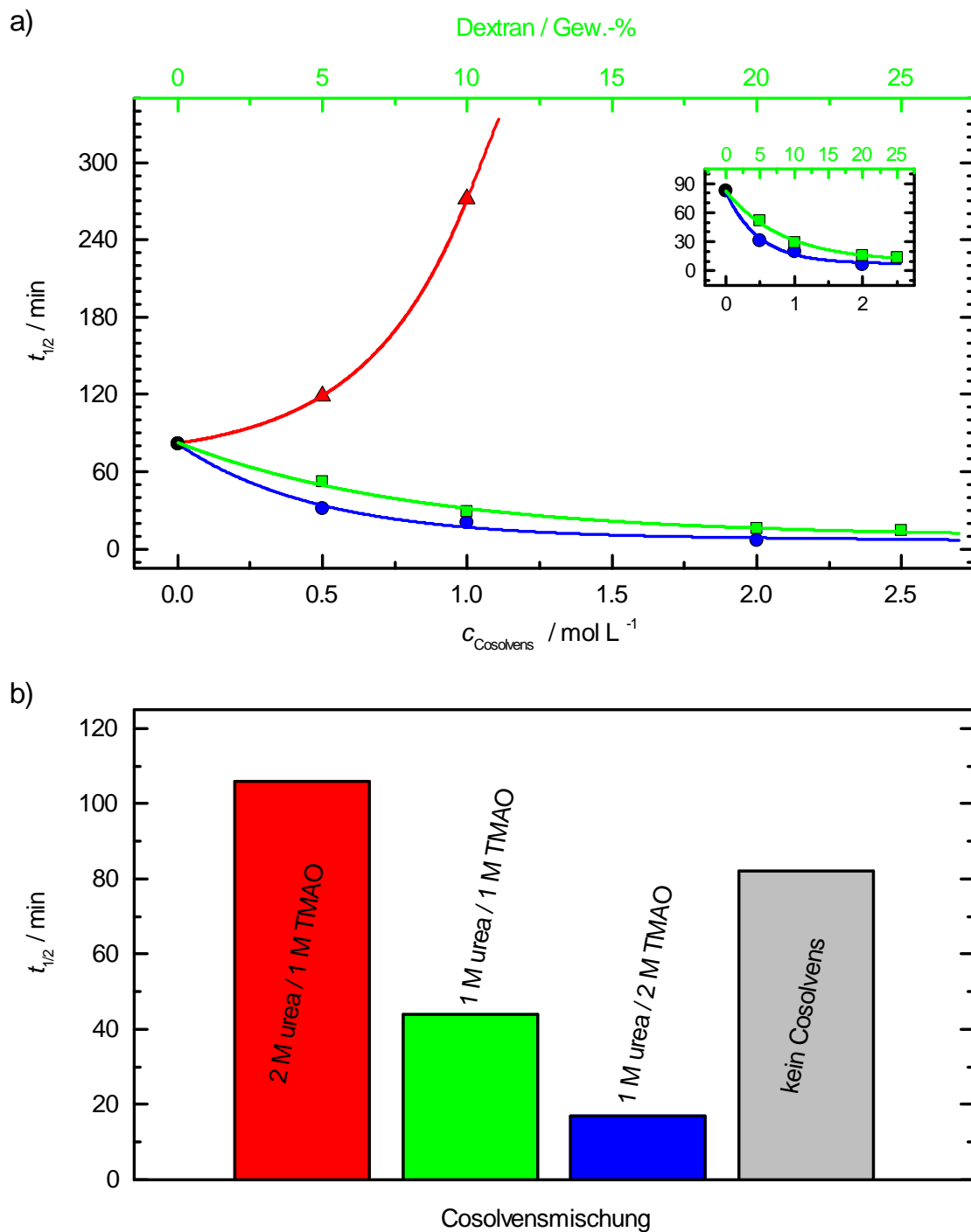


**Abbildung 4.8:** Pyren-Fluoreszenzdaten der Polymerisationsreaktion von 5  $\mu$ M Aktin in verschiedenen Konzentrationen an Harnstoff und Funktionsanpassungen mittels des analytischen Modells (schwarze Linien) bei 25 °C.

Harnstoff der Plateauwert der Pyren-Fluoreszenzintensität (Steady-State-Phase) signifikant abnimmt. Die durchgeführten Fluoreszenzanisotropie-Messungen weisen zudem eine Retardierung der Polymerisationsreaktion auf (Abb. 4.6) und sind somit in guter Übereinstimmung zu den Fluoreszenzintensitäts-Messungen. In der Plateau-Region der Steady-State-Phase weist die Fluoreszenzanisotropie einen Wert von  $r = 0.199 \pm 0.001$  auf, der im Vergleich zu Messungen ohne die Zugabe von Cosolventien signifikant geringer ist. Fluoreszenzanisotropie und -intensität werden im Bereich der Steady-State-Phase durch die Gegenwart von Harnstoff während des Polymerisationsprozesses signifikant reduziert, was auf eine verringerte Länge der gebildeten oder Anzahl an Aktinfilamenten und eine Erhöhung der kritischen Konzentration hindeutet. Dieser Effekt könnte auf den destabilisierenden Effekt, den Harnstoff auf die Proteinstruktur aufweist (z.B. durch die partielle Entfaltung von Proteindomänen), zurückzuführen sein. Die Bestimmung der kritischen Konzentration von Aktin, polymerisiert in Gegenwart von 1 M Harnstoff, hat ergeben, dass diese tatsächlich drastisch erhöht wurde. Im Vergleich zu F-Aktin, polymerisiert ohne Cosolvenzien, stieg die  $c_c$  von  $0.66 \mu\text{M}$  auf  $2.25 \mu\text{M}$  in Gegenwart von 1 M Harnstoff (Abb. 4.4). Es ist bekannt, dass hohe Konzentrationen Harnstoff zur Entfaltung von Proteinen, aufgrund von Bindungsbrüchen von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Aminosäuren des Proteinrückgrates, führen können.<sup>[225]</sup> Die allgemein akzeptierte Erklärung hierfür ist die Fähigkeit von Harnstoff mit dem Proteinrückgrat und polaren Seitenketten des Proteins Wasserstoff-Brücken auszubilden. Dieser Effekt führt zu einer bevorzugten Interaktion mit der Oberfläche des Proteins, die zugänglich für Solvensmoleküle ist (engl.: *solvent-accessible surface area*, SASA). Da die für Solvenzien zugängliche Proteinoberfläche von entfalten Proteinen größer ist, als von Proteinen in nativer Konformation, verschiebt Harnstoff das Gleichgewicht des  $F \rightleftharpoons U$ -Übergangs (F = gefaltete, native Proteinkonformation; U = entfaltete, denaturierte Proteinkonformation) seitens der entfalten Proteinkonformation.<sup>[121]</sup>

Die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse zeigen, wie sich eine derartige Veränderung der Proteinstabilität auf die Polymerisationsreaktion auswirken kann. Bereits moderate Konzentrationen von 0.5 bis 2 M des chaotropen Cosolvens Harnstoff scheinen zu einer partiellen Entfaltung von Aktinmonomeren zu führen, bevor die Polymerisationsreakti-



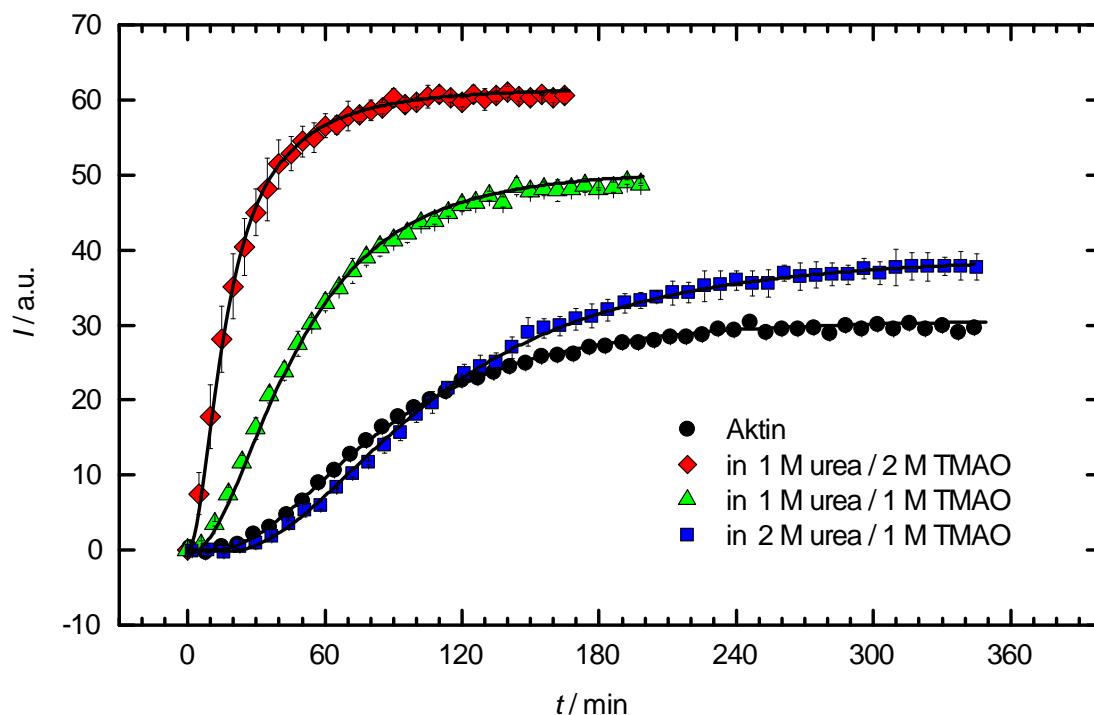


**Abbildung 4.9:** (a) Ermittelte Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  der Polymerisationskinetik von  $5 \mu\text{M}$  Aktin in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von TMAO (blaue Kreise), Harnstoff (rote Dreiecke) und Dextran (grüne Quadrate). (b) Ermittelte Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  der Polymerisationskinetik von  $5 \mu\text{M}$  Aktin in Gegenwart verschiedener TMAO / Harnstoff-Mischungen.

on durch Zugabe von KCl induziert wird. Dies spiegelt sich in einer drastischen Verlängerung der Lag-Phase des Polymerisationsprozesses des Proteins wider. Die Anpassung des Funktionsmodells aus Gleichung 4.1 an die experimentellen Daten (Abb. 4.8) liefert die jeweilige Nukleationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{SNUC}}$  (Abb. 4.5), die den beschriebenen Effekt quantifizieren. Mit steigender Konzentration an Harnstoff wird die Geschwindigkeitskonstante signifikant herabgesetzt, von  $4.1 \times 10^{-11} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  (ohne Harnstoff) auf  $3.56 \times 10^{-11} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  (0.5 M Harnstoff) und  $7.61 \times 10^{-12} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  (1 M Harnstoff). D.h. das Monomer  $\rightleftharpoons$  Oligomer (Nuklei)-Gleichgewicht wird mit steigender Konzentration an Harnstoff auf die Monomerseite verschoben. Dies führt somit zu einer effektiven Reduzierung der polymerisationskompetenten ATP-G-Aktin-Spezies, zu einer Verlängerung der Lag-Phase, einer Erhöhung der kritischen Konzentration und schlussendlich zu einer geringeren Population an gebildeten Aktinfilamenten.

### **TMAO kompensiert den Retardierungseffekt von Harnstoff**

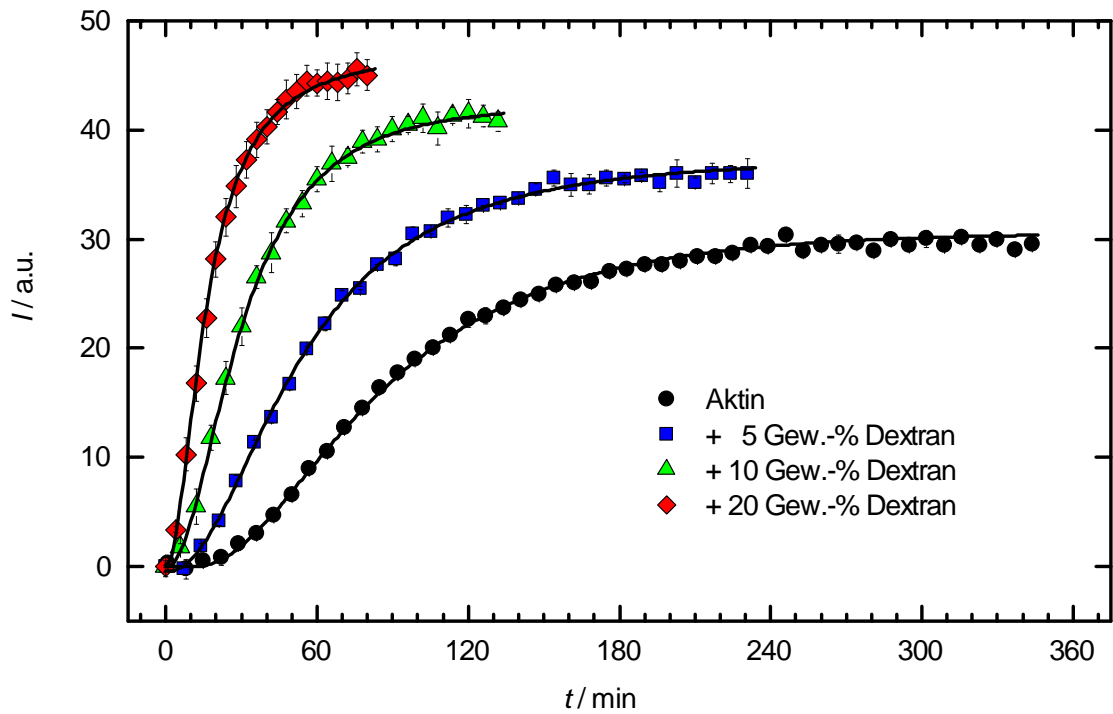
Zur Analyse des kombinierten Effekts von kosmo- und chaotropen Substanzen auf die Polymerisationskinetik von Aktin wurden verschiedene Konzentrationen sowie Konzentrationsverhältnisse an TMAO und Harnstoff eingesetzt. Transiente Fluoreszenzintensitätsmessungen von Pyren-Aktin weisen eine Art nichtkompetitives Verhalten der beiden Osmolyte auf (Abb. 4.10). Der Vergleich der Kinetik in 2 TMAO mit der in 2 M TMAO und 1 M Harnstoff zeigt, dass der gesamte Reaktionsprozess retardiert wird. Passend dazu wird die verlangsamte Reaktion in 1 M Harnstoff durch 2 M TMAO wieder beschleunigt. Werden beide Cosolvenzien in einem Verhältnis von 2 M Harnstoff: 1 M TMAO zugegeben, heben sich sowohl der Retardierungseffekt von Harnstoff als auch die beschleunigende Wirkung von TMAO gegenseitig auf, was an einer ähnlichen Form der Polymerisationskinetik und Halbwertszeit ersichtlich ist. D.h. TMAO weist bei äquivalenter Konzentration an Harnstoff einen stärkeren Effekt bzgl. der Polymerisationskinetik auf. Diese Erkenntnis ist in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten und wird ebenfalls beim Vergleich der Effekte auf die Geschwindigkeitskonstante der Nukleationsreaktion von 0.5 M Harnstoff oder 0.5 M TMAO ersichtlich.<sup>[117]</sup> Während 0.5 M Harnstoff eine leichte Herabsetzung der Geschwindigkeitskonstante zur Folge hat, steigert 0.5 M TMAO diese um eine Größenordnung (Abb. 4.5).



**Abbildung 4.10:** Pyren-Fluoreszenzdaten der Polymerisationsreaktion von 5  $\mu\text{M}$  Aktin in verschiedenen Konzentrationen und Konzentrationsverhältnissen von TMAO und Harnstoff und Funktionsanpassungen mittels des analytischen Modells (schwarze Linien) bei 25 °C.

### Makromolekulares Crowding beschleunigt die Polymerisationsreaktion

Mit dem Ziel, hinsichtlich der Konzentration an Makromolekülen zellähnliche Bedingungen zu imitieren, wurde Dextran verwendet und in Massenkonzentrationen zwischen 5 und 25 Gew.-% eingesetzt, um den Effekt auf den Polymerisationsprozess von Aktin zu studieren. Wie aus Abbildung 4.11 ersichtlich ist, wird die Polymerisationskinetik von Aktin mit zunehmendem Massenanteil an Dextran drastisch beschleunigt. Polymerisiert Aktin in Lösungen mit 5 Gew.-% Dextran, wird die Halbwertszeit der Kinetik bereits um 30 min reduziert (Abb. 4.9 a). Werden 20 Gew.-% Dextran eingesetzt, zellähnlichen Bedingungen entsprechend, verringert sich  $t_{1/2}$  von 82 min ohne den Zusatz von Dextran auf 16 min. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass mit steigender Konzentration an Dextran auch der Wert des Plateaus der Steady-State-Phase erhöht wird, was ein Hinweis auf die Bildung einer größeren Population oder längeren Filamenten ist. Dieser Effekt wiederum ist wahrscheinlich auf eine verringerte kritische Konzentration zurückzuführen, die aufgrund einer Erhöhung der Assoziationsge-



**Abbildung 4.11:** Pyren-Fluoreszenzdaten der Polymerisationsreaktion von 5  $\mu\text{M}$  Aktin in verschiedenen Konzentrationen Dextran sowie Funktionsanpassungen mittels des analytischen Modells (schwarze Linien) bei 25 °C.

schwindigkeitskonstanten des Polymerisationsprozesses resultiert. Wie bereits im Falle von TMAO beobachtet, führt auch die Gegenwart von Dextran zu einer signifikanten Verkürzung der Lag-Phase sowie Erhöhung der Steigung des Kurvenverlaufs während der Elongations-Phase. Aufgrund der Volumeneinschränkung (engl.: *excluded volume effect*), die das Protein in hochkonzentrierten Lösungen erfährt, scheint Dextran hier die Assemblierung zu fördern und verschiebt somit das Monomer  $\rightleftharpoons$  Oligomer (Nuklei)-Gleichgewicht auf die Seite der Oligomere.<sup>[226,227]</sup> Dieser Effekt ist in guter Übereinstimmung mit den in dieser Studie erhaltenen Daten. Des Weiteren kann der „excluded volume effect“ von Dextran durch den Vergleich mit den durchgeführten Simulationsexperimenten erläutert werden. Die für die Verkürzung der Lag-Phase und Vergrößerung der Steigung der Elongations-Phase / des Plateau-Wertes der Steady-State-Phase zugrundeliegenden Prozesse scheinen Anstiege der Nukleationsrate ( $k_{\text{SNUC}}$ ) und der Assoziationsrate ( $k_{\text{ASTB}}$ ) zu sein. Werden diese Geschwindigkeitskonstanten in den Simulationen der Polymerisationsreaktion variiert, so können sehr ähnliche Effekte erzielt werden. Eine Erhöhung von  $k_{\text{SNUC}}$  führt zur Verkürzung der Lag-Phase und ein Anstieg

von  $k_{\text{ASTB}}$  resultiert in einer erhöhten Steigung der Elongations-Phase und einer Erhöhung des Plateaus der Steady-State-Phase (Abb. 4.7), bzw. somit in einer Verringerung der kritischen Konzentration.

### 4.2.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In dieser Studie wurde Pyren-gelabeltes Aktin verwendet, um den Polymerisationsprozess von Aktin, basierend auf dem Anstieg der Fluoreszenzintensität während der G-zu-F-Transformation, unter verschiedenen Bedingungen bzgl. der Osmolytkonzentrationen an TMAO, Harnstoff und Dextran zu studieren. Veränderungen der Molekülgröße des polymerisierenden Systems konnten mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen detektiert werden.

Lebende Organismen sind in der Lage äußerem Stress (osmotisch, chemisch, Temperatur oder Druck) entgegenzuwirken, indem sie hohe Konzentrationen an natürlichen Osmolyten wie TMAO und Harnstoff akkumulieren. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften kann TMAO die Stabilität von Proteinen erhöhen, indem es die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen polaren Gruppen des Proteins und Wasser verstärkt.<sup>[114]</sup> Es ist ebenso bekannt, dass TMAO aufgrund seiner starken Wechselwirkungen mit Wassermolekülen in der Lage ist oligomere oder polymere Proteinstrukturen durch präferentielle Exklusion von der Proteingrenzfläche entropisch zu stabilisieren (engl.: *preferential hydration effect*).<sup>[121,205,213]</sup> Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass TMAO den Nukleationsprozess der Polymerisationsreaktion von Aktin beeinflusst bzw. beschleunigt, indem es das Gleichgewicht der Monomer  $\rightleftharpoons$  Oligomer (Nuklei)-Reaktion auf die Seite der oligomeren Spezies verschiebt, da es diese, wie beschrieben, stabilisiert. Dieser Effekt wird experimentell durch eine stark verkürzte Lag-Phase und Erhöhung der Steigung der Elongationsphase der Polymerisationskinetik detektiert. Des Weiteren wird die kritische Konzentration durch die Erhöhung von Assoziationsraten herabgesetzt, wodurch mehr oder längere Aktinfilamente entstehen können. Interessanterweise wurde neben dem beschleunigenden Effekt von TMAO auf den Polymerisationsprozess ebenso ein negativer Effekt bzgl. der Anlagerung von bereits gebildeten Filamenten gefunden.<sup>[117]</sup>

Harnstoff, ebenfalls ein natürlicher Osmolyt, zeigt aufgrund seiner chemischen Eigen-

schaften im Gegensatz zu TMAO eine präferentielle Akkumulation an Proteingrenzflächen, wie z.B. in der Nähe des Proteinrückrats und an Proteinseitenketten.<sup>[121,203,228,229]</sup> Es handelt sich bei der Denaturierung von Proteinen mittels Harnstoff also eher um einen direkten Mechanismus. Wie gezeigt, führen bereits moderate Konzentrationen an Harnstoff (0.5–2 M) zu einer Destabilisierung oder partiellen Entfaltung von Aktinmonomeren und zu einer Verschiebung des Monomer  $\rightleftharpoons$  Oligomer-Equilibriums zur Monomerseite. Dieser Effekt resultiert in einem drastischen Anstieg der Lag-Phase, was sich in einer Absenkung der Nukleationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{\text{SNUC}}$  des Polymerisationsprozesses widerspiegelt. So wurde  $k_{\text{SNUC}}$  von  $4.1 \times 10^{-11} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  (ohne Harnstoff) auf einen Wert von  $7.61 \times 10^{-12} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  (1 M Harnstoff) abgesenkt. Dieser Effekt führt ebenso zu einer Reduktion der Konzentration von polymerisationskompetenten Aktinmonomeren, zu einem Anstieg der kritischen Konzentration und somit zu einer geringeren Konzentration an gebildeten Aktinfilamenten. Zudem wäre es auch vorstellbar, dass Harnstoff an Regionen der Filamentenden bindet und somit ein Anbinden von weiteren Monomeren an das Filament und damit die Verlängerung des Filaments inhibiert.

In Experimenten, in denen Mischungen aus TMAO und Harnstoff eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass TMAO nicht ausschließlich den bzgl. der nativen Proteinkonformation und Stabilität schädigenden Effekt von Harnstoff entgegenwirken kann, sondern ebenfalls diesen Effekt bzgl. Protein-Protein-Interaktionen zu kompensieren vermag. Dieser Effekt ist am ausgeprägtesten zu erkennen, wenn ein Mischungsverhältnis von 1 M TMAO : 2 M Harnstoff vorliegt. In diesem Fall ist der destabilisierende und verzögernde Effekt von Harnstoff durch den stabilisierenden und beschleunigenden Einfluss von TMAO auf den Polymerisationsprozess nahezu komplett kompensiert. Dies kann ebenso anhand der ermittelten Nukleationsgeschwindigkeitskonstanten gesehen werden. Während in Gegenwart von 0.5 M Harnstoff  $k_{\text{SNUC}}$  nur leicht verringert wird, führt der Einsatz von 0.5 M TMAO bereits zu einem Anstieg dieser Geschwindigkeitskonstanten um eine Größenordnung (Abbildung 4.5). Ein derartiger Effekt ist wahrscheinlich auf direkte Interaktionen der Osmolyte in der Lösung zurückzuführen.

Durch die Zugabe des makromolekularen Crowders Dextran konnte der Effekt des Volumenausschlusses, wie er *in vivo* vorliegt, imitiert werden. Basierend auf der „ex-

cluded volume“-Theorie werden Molekülinteraktionen verstärkt, Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten erhöht und chemische Gleichgewichte in Richtung von assoziierten Spezies verschoben.<sup>[126,227]</sup> In der Tat konnten unter Einsatz von 20 Gew.-% Dextran, was annähernd zellähnlichen Bedingungen entspricht, die genannten Effekte auch bei der Polymerisationsreaktion von Aktin nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit der Polymerisationsreaktion wurde von 82 min ohne Dextran auf 16 min in Gegenwart von 20 Gew.-% Dextran verkürzt und ebenso konnte ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität des Plateauwertes der Steady-State-Phase nachgewiesen werden, was auf eine höhere Konzentration oder längere Aktinfilamente, basierend auf einer Absenkung der kritischen Konzentration, hindeutet. Simulationsexperimente haben gezeigt, dass der Anstieg von  $k_{\text{SNUC}}$  oder  $k_{\text{ASTB}}$  um etwa eine Größenordnung einen solchen Effekt verursachen könnte.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die in dieser Studie durchgeführten experimentellen Ergebnisse und simulierten Daten eindeutig die ausgeprägte Sensitivität von Assoziationsgleichgewichten, wie das der Polymerisationsreaktion von Aktin, auf Veränderungen der Konzentrationen an Cosolvenzien und räumliche Einschränkung, wie z.B. verursacht durch hohe Konzentrationen an Makromolekülen, wie *in vivo* oder in dieser Studie imitiert durch Dextran, aufzeigen. Diese signifikanten Einflüsse sollten bei der Diskussion von Polymerisationsreaktionen (z.B. Aktin, Tubulin) im zellulären Kontext berücksichtigt werden.

## 4.3 Kombinierte Effekte von Temperatur, Druck und Cosolventien auf die Polymerisationskinetik von Aktin

### 4.3.1 Material und Methoden

#### Materialien und Probenpräparation

Pyren-gelabeltes (10 %) und ungelabeltes  $\alpha$ -Aktin (aus Kaninchenskelettmuskel), G- und F-Puffer wurden von HYPERMOL (Bielefeld, Deutschland), Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) bezogen. Vor den jeweiligen Experimenten wurde G-Aktin gegen G-Puffer (2 mM Tris-Cl, pH 8.2, 0.4 mM ATP, 0.5 mM DTT, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) dialysiert und anschließend zentrifugiert (100000 *g*, 4 °C, 3 h), um mögliche Proteinaggregate abzutrennen. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mittels der Biuret-Methode bestimmt, bevor dieser in den Experimenten verwendet wurde. Die Polymerisationsreaktion wurde durch Zugabe von F-Puffer (10 mM Imidazol, pH 7.4, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM KCl, 1 mM ATP) induziert.

#### Stopped-Flow-Experimente

Druckabhängige Messungen der G-zu-F-Transformation von Aktin wurden an einem Hochdruck-Stopped-Flow-System Hi-Tech Scientific HPSF-56 durchgeführt.<sup>[231]</sup> Dieses Messsystem ermöglicht Messungen mit Drücken bis zu 2 kbar (schematische Darstellung Abb. 4.12). Die temperaturabhängigen Messungen wurden an einem Hi-Tech Scientific SHU-61SX2 durchgeführt. Beide Stopped-Flow-System stammen von der Firma TgK Scientific (Bradford on Avon, UK). Das Hochdruckmesssystem beinhaltet zwei bewegliche Reaktant-Spritzen und eine Sammelspritze. Diese Spritzen sind innerhalb des Autoklaven zu finden, der mit lichtdurchlässigen und druckstabilen Saphirfenstern zur Fluoreszenzanregung und Detektion der emittierten Strahlung der Probe ausgestattet

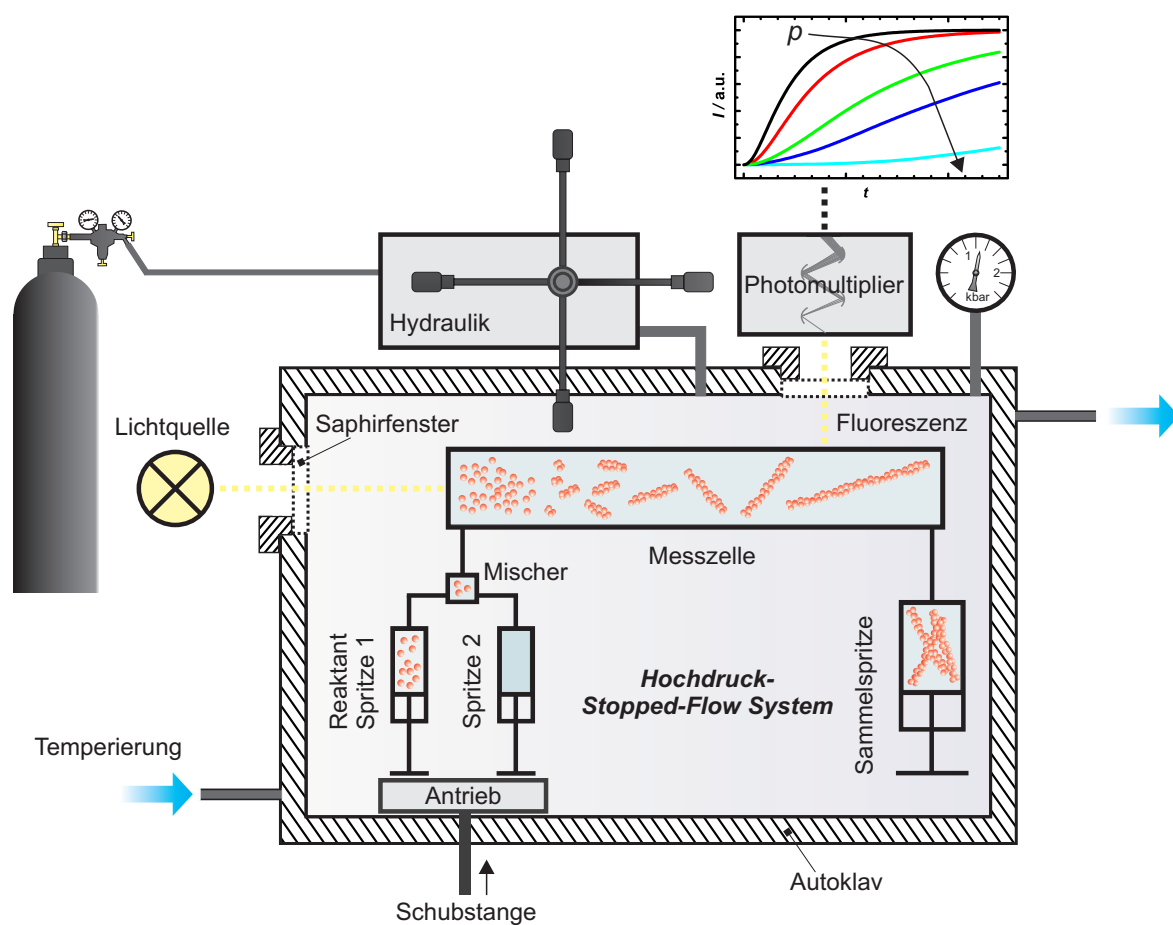
---

Teile dieser Studie wurden in folgender Referenz veröffentlicht:

Rosin, C., K. Estel, J. Hälker, and R. Winter. **2015**. Combined Effects of Temperature, Pressure, and Co-Solvents on the Polymerization Kinetics of Actin. *ChemPhysChem*. 16(7): 1379-1385.<sup>[230]</sup>



ist. Zur Anregung der Fluoreszenz der Probe wurde ein Langpassfilter (L-37, Cut-Off:  $370\text{ nm} \pm 6$ ) der Firma Edmund Optics (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Totzeit des Hochdruck-Stopped-Flow-Systems beträgt  $\sim 2\text{ ms}$ . Alle Messungen wurden mit  $18.4\text{ }\mu\text{M}$  Pyren-Aktin-Lösungen (10 %) in Reaktant-Spritze 1 und demselben Volumen an 2-fach konzentriertem F-Puffer (20 mM Imidazol, pH 7.4, 200 mM KCl, 2 mM ATP) in Spritze 2 durchgeführt. Zur Analyse des Effekts von Cosolventien wurden bei Verwendung dieser jeweils 1 M Lösungen oder Mischungen vorab zur Proteinlösung gegeben.



**Abbildung 4.12:** Schematische Darstellung des Hochdruck-Stopped-Flow-Messsystems HPSF-56.

### Simulation des Polymerisationsprozesses von Aktin

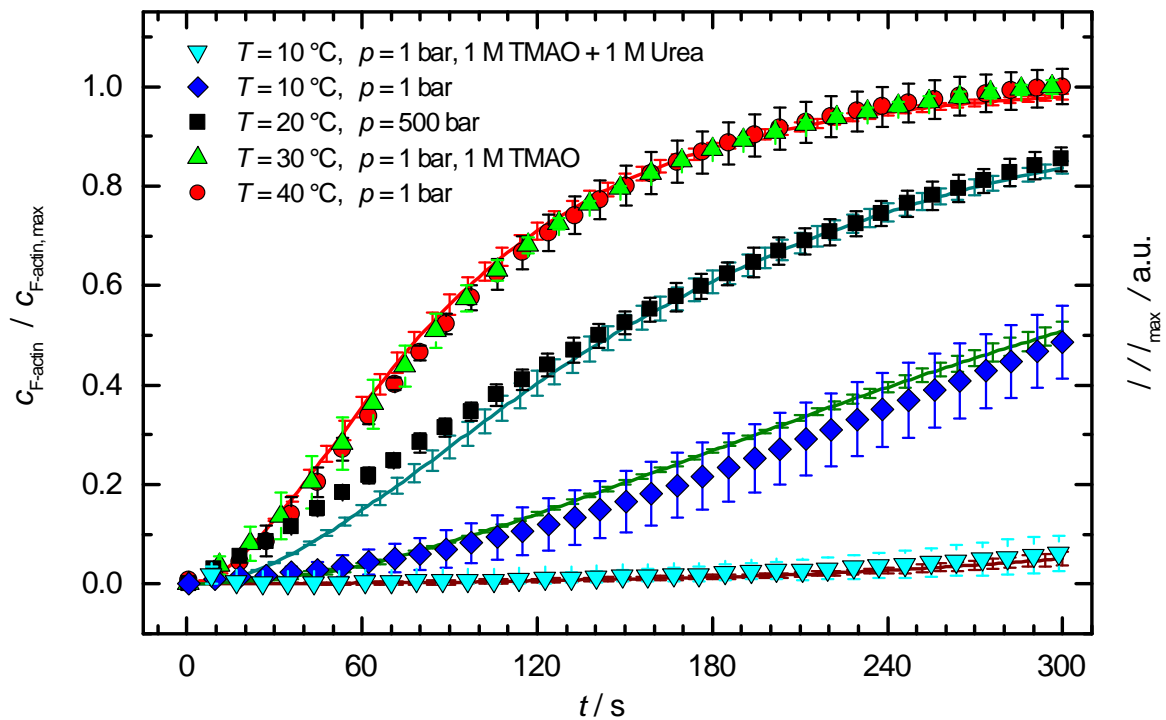
Zur quantitativen Beschreibung der Polymerisationsreaktion in Abhängigkeit von Temperatur, Druck und Cosolventien wurde ein Simulationsmodell verwendet, das auf Mon-

te Carlo-Simulationen basiert und die maßgeblichen Reaktionen des Polymerisationsprozesses integriert: *ActinSimChem*.<sup>[76]</sup> Dieses Simulationsmodell berücksichtigt die in Abbildung 4.1 dargestellten Reaktionen, die der Polymerisationsreaktion zu Grunde gelegt werden. Zur Simulation der Polymerisationsreaktion wurden die in Tabelle 4.2 dargestellten Geschwindigkeitskonstanten verwendet.

**Tabelle 4.2:** Geschwindigkeitskonstanten für den Polymerisationsprozess von Aktin

Geschwindigkeitskonstante	Wert	Referenz	Angepasster Wert
$k_{\text{SNUC}}$	$1.1 \times 10^{-9} \text{ } \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	[76]	$2.0 \times 10^{-9} \text{ } \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$
$k_{\text{ASTB}}$	$11.5 \text{ } \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{ASDB}}$	$3.8 \text{ } \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{ASTP}}$	$1.3 \text{ } \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{ASDP}}$	$0.16 \text{ } \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{DITB}}$	$1.4 \text{ s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{DIPB}}$	$1.4 \text{ s}^{-1}$	[64] [219]	identisch
$k_{\text{DIDB}}$	$7.2 \text{ s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{DITB}}$	$0.8 \text{ s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{DIPP}}$	$0.8 \text{ s}^{-1}$	[64] [219]	identisch
$k_{\text{DIDP}}$	$0.27 \text{ s}^{-1}$	[64]	identisch
$k_{\text{TTOP}}$	$0.3 \text{ s}^{-1}$	[220] [67]	identisch
$k_{\text{PTOD}}$	$2.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	[67] [68]	identisch
$k_{\text{DTOT}}$	$20 \text{ s}^{-1}$	[221]	identisch

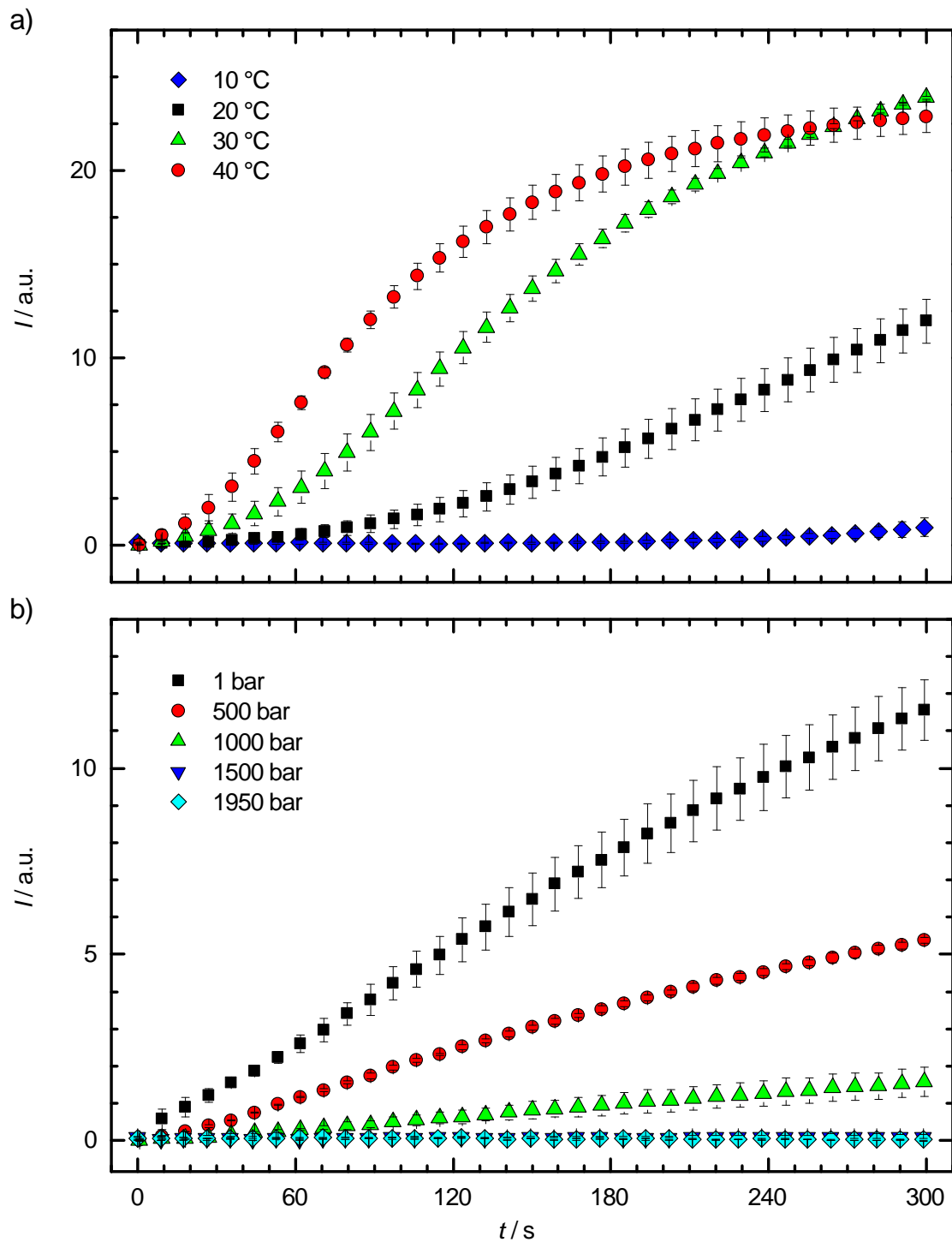
Für weitere Details bzgl. des Simulationsprogramms und mechanistischer Modelle für den Polymerisationsprozess von Aktin siehe Kapitel 4.2.1 und Referenzen<sup>[68,76,218]</sup>. Simulationen wurden unter Verwendung identischer Konzentrationen an Aktin ( $c_{\text{G-Aktin}} = 9.2 \text{ } \mu\text{M}$ ), die auch im Experiment eingesetzt wurden, durchgeführt. Unter Verwendung der in Tabelle 4.2 dargestellten Geschwindigkeitskonstanten konnte die G-zu-F-Transformation von Aktin zunächst bei einer Temperatur von  $20 \text{ } ^\circ\text{C}$  und Atmosphärendruck und ausgehend von diesen Konstanten im Anschluss bei verschiedenen Temperaturen, Drücken und in Gegenwart von Cosolventien simuliert werden (Beispiele s. Abb. 4.13). Zum Vergleich der simulierten Daten mit den experimentellen Kinetiken wurden diese jeweils auf den Plateauwert normiert.



**Abbildung 4.13:** Beispiele von simulierten (Kurven mit Fehlerbalken) und experimentellen Daten (Datenpunkte mit Fehlerbalken). Experimentelle (normierte Pyren-Fluoreszenzintensität  $I/I_{\max}$ ) und simulierte (Signal normiert auf die maximal gebildete Konzentration an F-Aktin  $c_{\text{F-Aktin}}/c_{\text{F-Aktin,max}}$ ) Polymerisationskinetik von  $9.2\ \mu\text{M}$  Aktin bei verschiedenen Temperaturen, Drücken und Konzentrationen an Cosolventien.

### 4.3.2 Ergebnisse und Diskussion

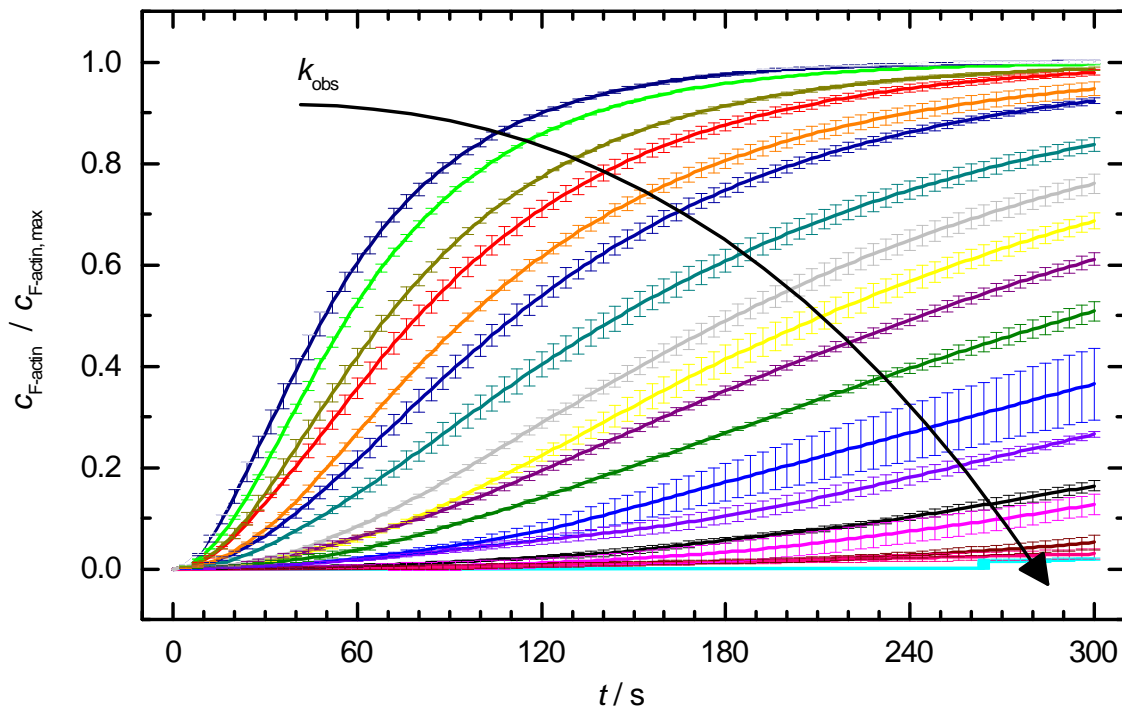
Abbildungen 4.14, 4.17, 4.20 und 4.21 zeigen die Auswirkungen von Temperatur, Druck und Cosolventien auf die Polymerisationskinetik von Aktin. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität  $I$  ist proportional zur akkumulierten Konzentration an F-Aktin  $c_{\text{F-Aktin}}$ . Es ist ersichtlich, dass ein Temperaturanstieg zwischen 10 und 40 °C eine signifikante Beschleunigung des Polymerisationsprozesses in Abwesenheit von Cosolventien (Abb. 4.14 a), als auch in Gegenwart von 1 M TMAO (Abb. 4.17 a), 1 M Harnstoff (Abb. 4.20 a) oder einem Gemisch beider Substanzen (Abb. 4.21 a) zur Folge hat. Die Effekte, die eine Kompression der Probe im Bereich zwischen 1 und 2000 bar zur Folge haben, sind in Abbildungen 4.14 b (Aktin ohne Zusatz von Cosolventien), 4.17 b (1 M TMAO) und 4.20 b (1 M Urea) dargestellt. Bei allen untersuchten Proben führte eine Kompression der Probe im genannten Druckbereich zu einer Verlangsamung des Polymerisationsprozesses von Aktin. Zur Quantifizierung der erhaltenen Resultate wurde ein Simulations-



**Abbildung 4.14:** Temperatur- (a) und Druckeffekt (b) auf die Polymerisationskinetik von 9.2  $\mu\text{M}$  Aktin. Alle druckabhängigen Messungen wurden bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt.

modell verwendet, das auf Monte Carlo Simulationen basiert und die maßgeblichen Reaktionen des Polymerisationsprozesses integriert: *ActinSimChem*.<sup>[76]</sup> Simulationen der

Kinetik des Polymerisationsprozesses von Aktin mittels dieser Software ermöglichen die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der zugrundeliegenden Reaktionsprozesse. Basierend auf Simulationen der Polymerisationsreaktion mittels *ActinSimChem* wurde herausgefunden, dass dieser Prozess nur für einige der Geschwindigkeitskonstanten eine hohe Sensitivität aufweist:  $k_{\text{SNUC}}$ ,  $k_{\text{ASTB}}$ ,  $k_{\text{ASDB}}$ ,  $k_{\text{DIPB}}$ ,  $k_{\text{DIDB}}$ ,  $k_{\text{DITB}}$ , die die Nukleationsreaktion und die Assoziations- und Dissoziationsreaktionen von Aktinmonomeren am (+)-Ende des Filaments beschreiben.<sup>[76]</sup> Die erhöhte Sensitivität ist darin begründet, dass diese Raten ca. um eine Größenordnung höher liegen als die Analoga am (-)-Ende des Filaments. Um im Folgenden die Einflüsse von Temperatur, Druck und Cosolventien auf die Kinetik der Polymerisationsreaktion von G- zu F-Aktin zu analysieren, wurden die Geschwindigkeitskonstanten schrittweise variiert, um die erhaltenen experimentellen Daten zu simulieren. Es hat sich herausgestellt, dass im Falle der  $\text{Mg}^{2+}$ -induzierten Polymerisation maßgeblich die Variation der Geschwindigkeits-



**Abbildung 4.15:** Simulation des Polymerisationsprozesses von  $9.2 \mu\text{M}$  Aktin über einen Zeitraum von  $300 \text{ s}$  mittels *ActinSimChem*.<sup>[76]</sup> Zur Simulation wurden die in Tabelle 4.2 dargestellten Geschwindigkeitskonstanten verwendet. Die Geschwindigkeitskonstante des Nukleationsprozesses  $k_{\text{SNUC}}$  wurde über mehrere Größenordnungen ( $8 \times 10^{-8} - 6 \times 10^{-11} \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) variiert, um die experimentellen Daten zu simulieren.

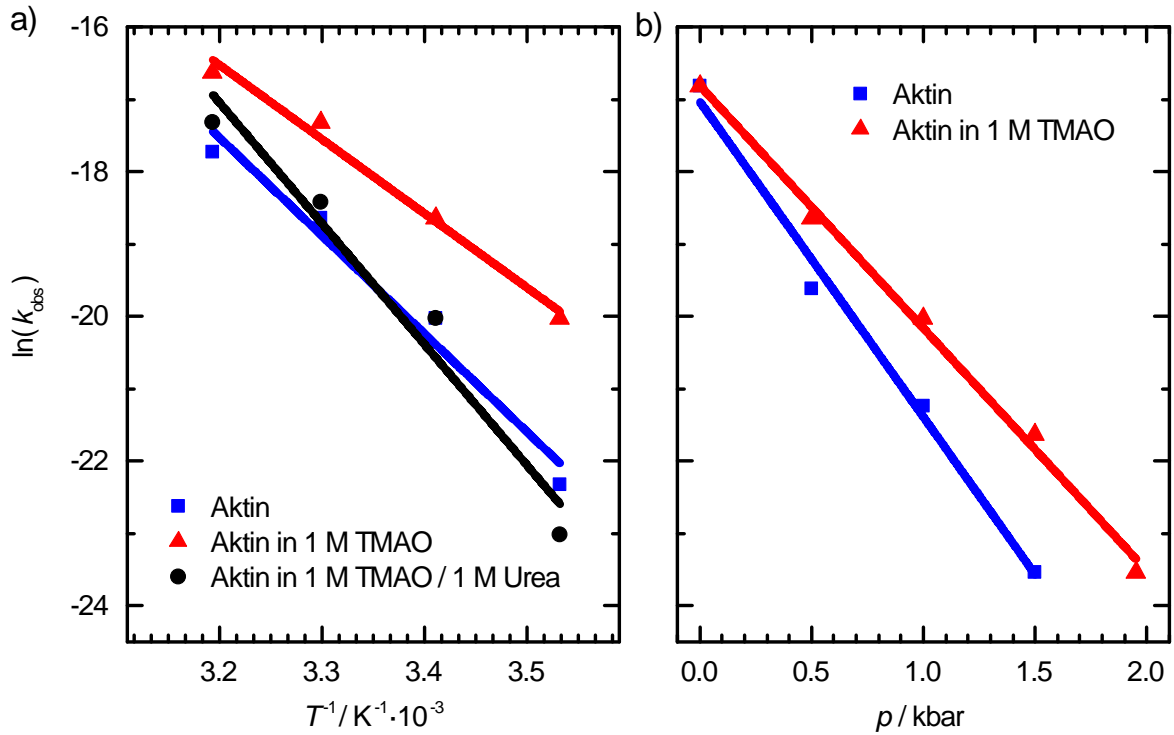
konstanten der Nukleationsreaktion  $k_{\text{SNUC}}$ , die in den Simulationen gefundenen Effekte beschreibt (Abb. 4.15). Dies wurde ebenfalls in einer Studie von Zimmerle et al. beobachtet: Eine Erhöhung der Temperatur von 10 auf 35 °C erhöhte die Nukleationsrate der  $\text{Mg}^{2+}$ -induzierten Polymerisationsreaktion um vier Größenordnungen. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der weiteren am Prozess beteiligten Reaktionen änderten sich hingegen in Relation nur geringfügig.<sup>[232]</sup> Basierend auf der Temperaturabhängigkeit der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten (Formel 4.7) für den initialen Schritt der G-zu-F-Transformation,  $k_{\text{obs}} \approx k_{\text{SNUC}}$ , kann die Aktivierungsenergie  $E_a$  für den Nukleationsschritt der Reaktion in An- und Abwesenheit von Cosolventien bestimmt werden. Das Aktivierungsvolumen  $\Delta V^\ddagger$  ist über die Druckabhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  durch Formel 4.8 gegeben.

$$\frac{\partial \ln k_{\text{obs}}}{\partial (1/T)} = -\frac{E_a}{R} \quad (4.7)$$

$$\frac{\partial \ln k_{\text{obs}}}{\partial p} = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (4.8)$$

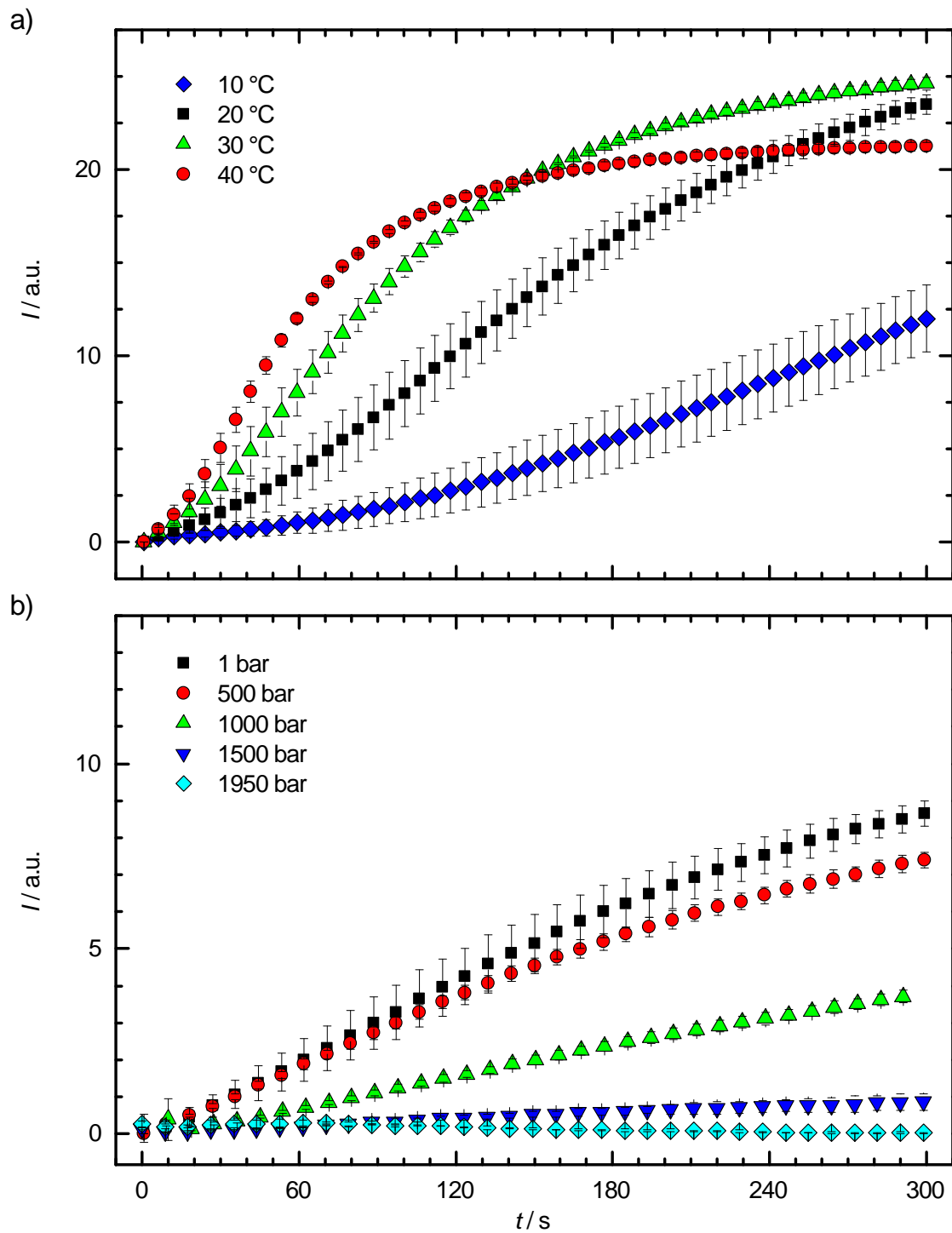
In Abwesenheit von Cosolventien (Abb. 4.14 a) wird der Polymerisationsprozess bei einer Temperatur von 10 °C drastisch verlangsamt, sodass innerhalb des gemessenen Zeitintervalls keine Elongationsphase mehr auftritt. Eine Erhöhung der Temperatur auf 20 °C resultiert bereits in einer erheblichen Beschleunigung der Polymerisationsreaktion: Nach etwa ~40 s entstehen erste elongationskompetente Nuklei. Bei einer Temperatur von 30 °C wird die Lag-Phase der Reaktion weiter verkürzt und bei einer Temperatur von 40 °C ist der gesamte Polymerisationsprozess nach ~300 s in der Steady-State-Phase angelangt. Die zum jeweiligen Nukleationsprozess zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten der Temperaturen 10, 20, 30 und 40 °C wurden zu  $1 \times 10^{-10}$ ,  $2 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  und  $3 \times 10^{-8} \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$  bestimmt. Die ARRHENIUS-Auftragung liefert die Aktivierungsenergie des Nukleationsschrittes der Polymerisationsreaktion von  $E_a = 139 \pm 20 \text{ kJ mol}^{-1}$  ( $\approx 56 k_B T$ ) (Abb. 4.16 und 4.18). Dieser Wert ist vergleichbar mit dem für die Nukleationsreaktion der Fibrillenbildung der leichten Kette eines Antikörpers ( $E_a = 159 \pm 20 \text{ kJ mol}^{-1}$ ).<sup>[139]</sup>

Eine Erhöhung des Drucks zeigt einen entgegengesetzten Effekt auf die Polymerisationsreaktion von Aktin im Vergleich zur Temperatur. Wie in Abbildung 4.14 b zu



**Abbildung 4.16:** ARRHENIUS-Auftragung (a) und Auftragung der ermittelten Nukleationsgeschwindigkeitskonstante gegen den Druck (b) zur Berechnung der Aktivierungsenergie und des Aktivierungsvolumens des Nukleationsprozesses.

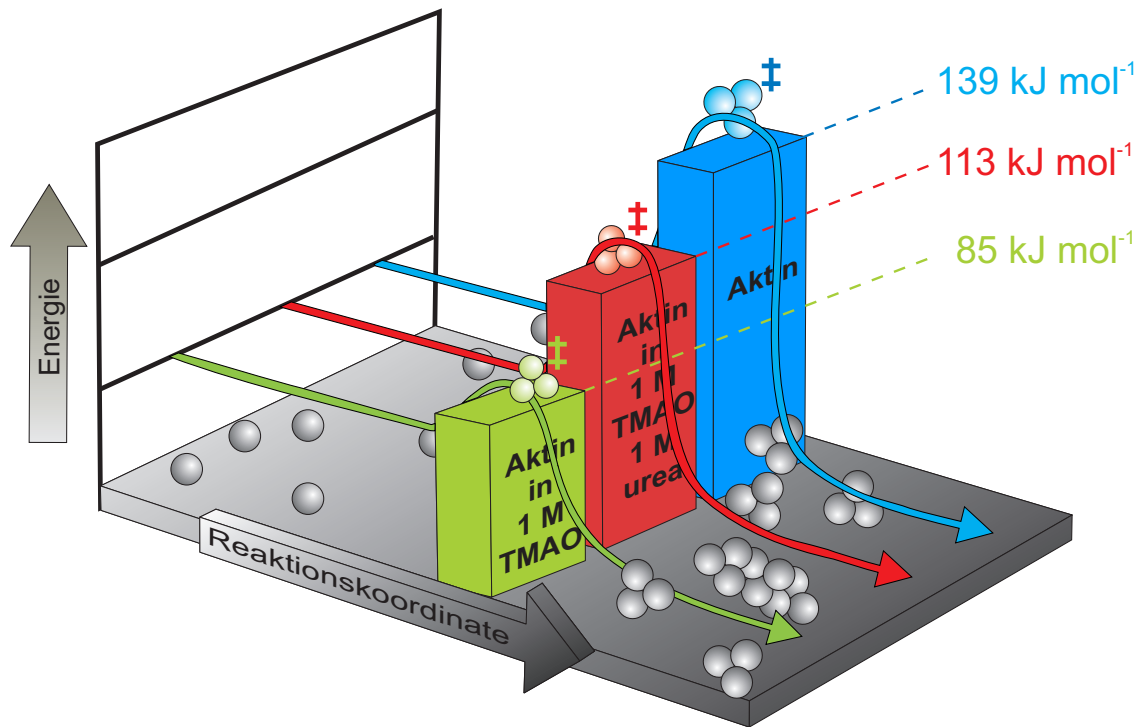
erkennen, ist der Polymerisationsprozess bereits bei einigen Hundert bar signifikant verlangsamt. Die Nukleationsphase wird mit steigendem Druck verzögert und somit setzt auch die Elongationsphase zu späteren Zeitpunkten ein. Bei einem Druck von 2000 bar wird im gemessenen Zeitintervall von 300 s keine Nukleationsreaktion mehr detektiert. Die ermittelten Nukleationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{SNUC}}$  bei einer Temperatur von 20 °C und Drücken von 500, 1000 und 1500 bar betragen  $3 \times 10^{-9}$ ,  $6 \times 10^{-10}$  und  $6 \times 10^{-11} \mu\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Die Kinetik bei einem Druck von 2000 bar kann nicht simuliert werden, da diese im gemessenen Zeitintervall keinerlei Veränderungen aufweist und somit ist die Bestimmung von  $k_{\text{SNUC}}$  nicht möglich. Nach Gleichung 4.8 liefert die Steigung der Auftragung von  $\ln k_{\text{SNUC}}$  vs.  $p$  das Aktivierungsvolumen der Nukleationsreaktion  $\Delta V^\ddagger$  (Abb. 4.16). Der ermittelte Wert von  $\Delta V^\ddagger = 104 \pm 8 \text{ mL mol}^{-1}$  lässt nach dem Prinzip von LE CHÂTELIER den Schluss zu, dass der Übergangszustand ein größeres Volumen aufweist als der Ausgangszustand. Dies führt dazu, dass die Geschwindigkeit der Reaktion mit steigendem Druck reduziert wird. Ähnliche Effekte wurden für die Bildung von Proteinmultimeren und amyloidbildenden Polypeptiden gefunden.<sup>[13,103,191,209,233,234]</sup>



**Abbildung 4.17:** Temperatur- (a) und Druckeffekt (b) auf die Polymerisationskinetik von  $9.2 \mu\text{M}$  Aktin in Gegenwart von 1 M TMAO. Alle druckabhängigen Messungen wurden bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Zur Untersuchung der Effekte des natürlichen Osmolyts TMAO auf die Polymerisationsreaktion von Aktin wurde die Polymerisationsreaktion in Abhängigkeit von

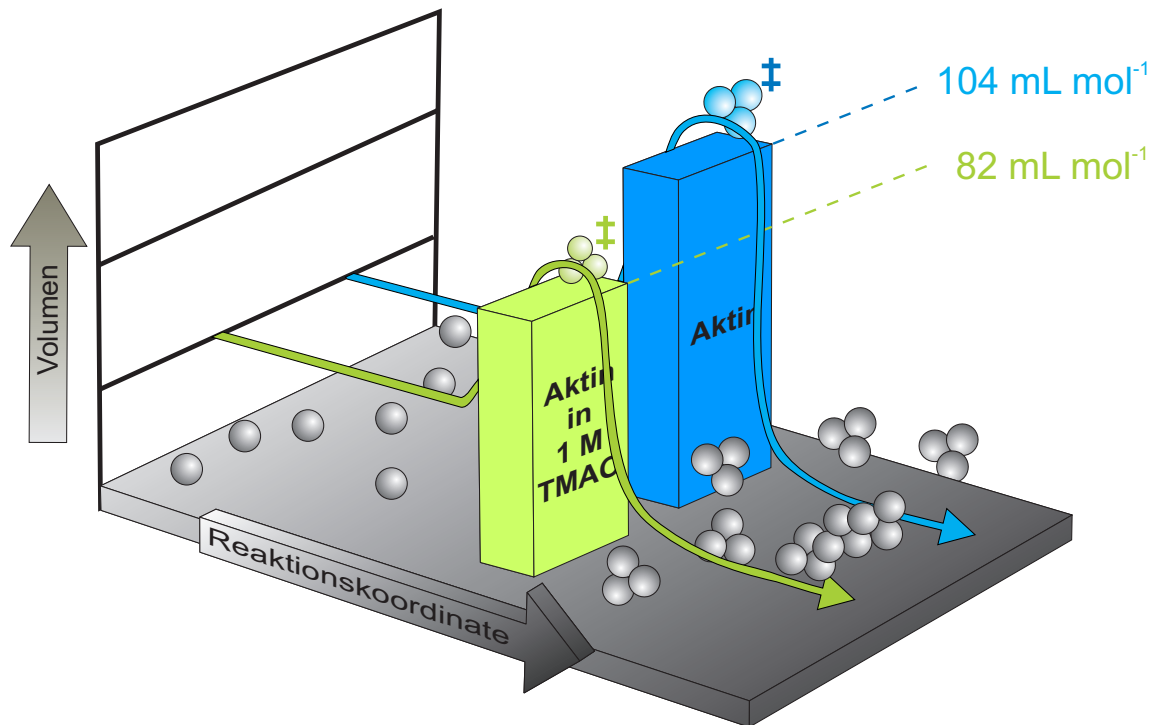




**Abbildung 4.18:** Energieprofil für den Nukleationsprozess der Polymerisationsreaktion von Aktin in Ab- und Anwesenheit der Cosolventien TMAO und Harnstoff. Die ermittelten Aktivierungsenergien  $E_a$  sind ebenfalls eingezeichnet.

Temperatur und Druck in Gegenwart von 1 M TMAO verfolgt. Es ist bekannt, dass TMAO in der Lage ist, die native Konformation von Proteinen in Organismen, die äußerem Stress (z.B. hohe Temperatur, hydrostatischer oder osmotischer Druck) ausgesetzt sind, zu stabilisieren.<sup>[114,119,121,206]</sup> Aus diesem Grund wird diese Substanz auch als „chemisches Chaperon“ bezeichnet.<sup>[113]</sup> Wird der Polymerisationsprozess von Aktin in Gegenwart von TMAO induziert, so resultiert eine signifikante Beschleunigung der Reaktion. Dies wird beim Vergleich der Reaktionsprofile bei 10 °C in An- (Abb. 4.17 a) und Abwesenheit (Abb. 4.14 a) von 1 M TMAO ersichtlich. Bei Zugabe von 1 M TMAO beginnt der Polymerisationsprozess bei ~40 s und ohne TMAO bei ~280 s, was auf eine Zunahme der Nukleationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{SNUC}}$  um eine Größenordnung zurückzuführen ist. Des Weiteren ist bei einer Temperatur von 30 °C und in Gegenwart von TMAO die Steady-State-Phase der Reaktion bereits nach etwa 300 s erreicht. Ohne TMAO hingegen, wird der Polymerisationsprozess innerhalb dieses Zeitraums nicht abgeschlossen (vgl. Abb. 4.14 a vs. 4.17 a). Dieser drastische Unterschied liegt in der Herabsetzung der Aktivierungsenergie  $E_a$  des Nukleationsprozesses von ~40 %

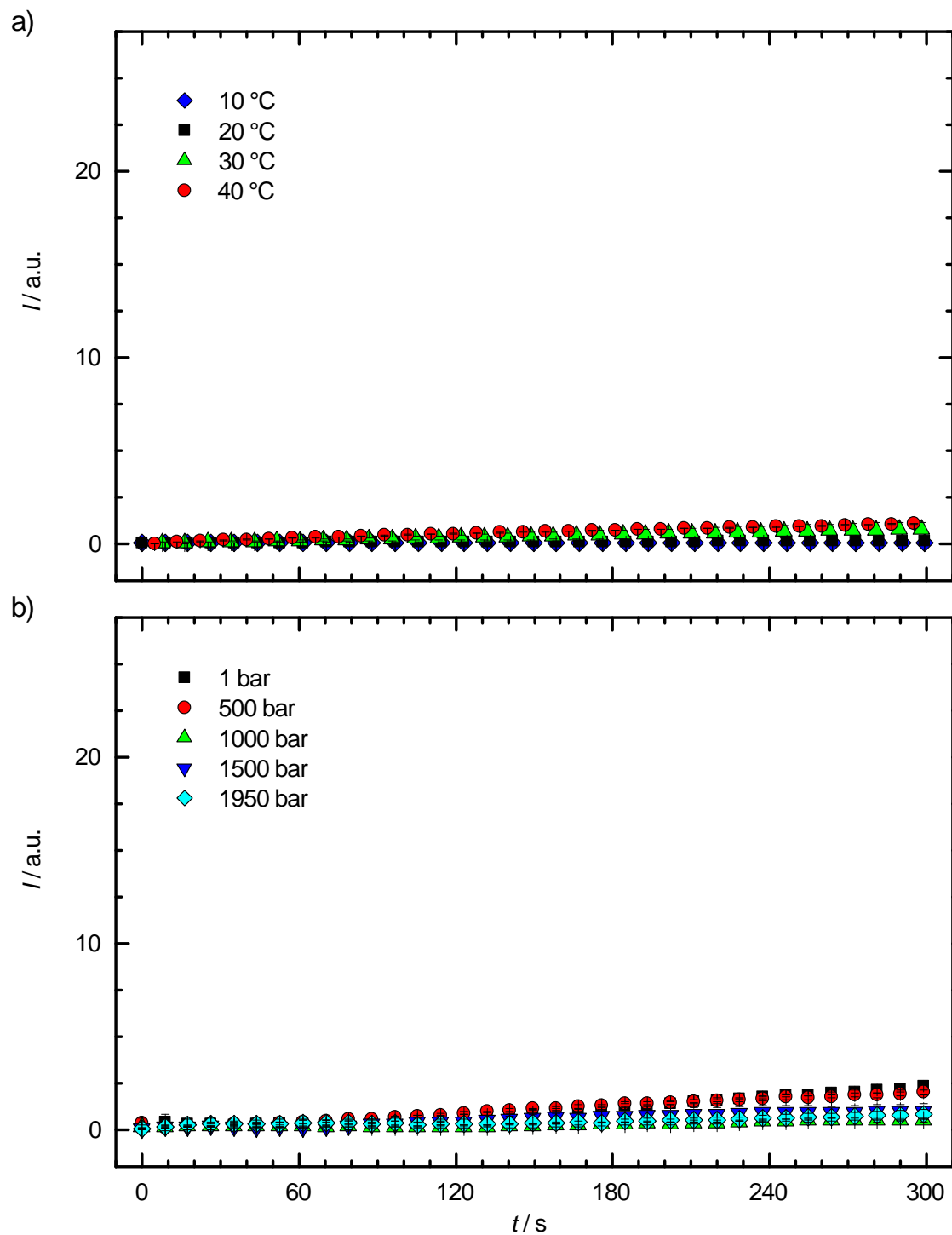
(Abb. 4.16). TMAO weist zudem einen schützenden Effekt gegen hohe Drücke auf, wie aus Abbildung 4.17 b ersichtlich wird. In Abwesenheit von TMAO hat eine Erhöhung des Drucks auf 500 bar eine drastische Reduzierung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge. In Anwesenheit von TMAO hingegen fällt dieser Effekt wesentlich geringer aus. Die Analyse der Daten ergibt ein Aktivierungsvolumen für den Nukleationsprozess der Polymerisationsreaktion von  $\Delta V^\ddagger = 82 \pm 3 \text{ mL mol}^{-1}$  in Gegenwart von 1 M TMAO (Abb. 4.16). Der um ~21 % reduzierte Wert im Vergleich zur Reaktion ohne TMAO (Abb. 4.19) weist auf einen durch TMAO begünstigten, kompakteren Übergangszustand der polymerisationskompetenten Nuklei hin. Durch starke Wechselwirkungen zwischen TMAO und Wasser kann eine Stabilisierung von oligomeren oder polymeren Proteinstrukturen basierend auf der präferentiellen Exklusion der TMAO-Moleküle von der Proteingrenzfläche resultieren („preferential hydration effect“).<sup>[116,118]</sup> Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass TMAO einen Effekt auf den Nukleationsprozess der Polymerisationsreaktion aufweist, indem es oligomere Strukturen (Nuklei) stabilisiert und somit das Monomer  $\rightleftharpoons$  Oligomer-Gleichgewicht auf die Seite der Nuklei verschiebt. Dieser Effekt erklärt die erhöhte Geschwindigkeit der Nukleationsreaktion und die ebenfalls signifikant reduzierte Lag-Phase des Polymerisationsprozesses. Interessanterweise ist TMAO ebenso in der Lage die Stabilität von Proteinen in Bezug auf Temperatur und Druck zu erhöhen. Es hat sich herausgestellt, dass natürliche Osmolyte, die zur Proteinstabilisierung beitragen, die Eigenschaft aufweisen mit dem Proteinrückgrat, das im denaturierten Zustand zunehmend exponiert wird, nicht bevorzugt zu interagieren; es handelt sich hierbei um eine solvophobe thermodynamische Triebkraft: den osmophoben Effekt.<sup>[112]</sup> Bolen et al. haben des Weiteren gezeigt, dass somit aufgrund der ungünstigen Wechselwirkungen zwischen TMAO und dem Proteinrückgrat die denaturierte Proteinkonformation im Vergleich zur nativen Konformation weniger stabil ist.<sup>[112]</sup> Molekulardynamik-Simulationen lassen zugleich den Schluss zu, dass TMAO die Wasserstruktur verstärkt, indem die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen pro Wassermolekül erhöht wird, stärkere Wasserstoffbrückenbindungen auftreten und es zu einer weitreichenden Ordnung des Lösungsmittels kommt.<sup>[118,204,207]</sup> Somit konkurriert TMAO nicht mit Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Proteinstruktur und führt nicht zum Aufbrechen des hydrophoben Proteininneren.<sup>[204]</sup> Es ist weiterhin be-



**Abbildung 4.19:** Volumenprofil für den Nukleationsprozess der Polymerisationsreaktion von Aktin in Ab- und Anwesenheit von TMAO. Die ermittelten Aktivierungsvolumina  $\Delta V^\ddagger$  sind ebenfalls eingezeichnet.

kennt, dass hohe Drücke zur Schwächung hydrophober Wechselwirkungen führen.<sup>[183]</sup> Da die Anlagerungen von Protomeren innerhalb des Aktinfilamentes zu einem großen Teil auf Wechselwirkungen hydrophober Natur beruhen,<sup>[79,159]</sup> führen hohe Drücke zur Destabilisierung dieser und zur Dissoziation von Filamenten. Aufgrund der stabilisierenden Wirkung von TMAO auf die native Proteinstruktur, kann dieser Osmolyt der druckinduzierten Schwächung hydrophober Interaktionen entgegenwirken und somit, wie in dieser Studie dargestellt, oligomere Spezies stabilisieren.

Zur Analyse des Effektes von Harnstoff, einer chaotropen Substanz, auf den Polymerisationsprozess von Aktin wurden Lösungen mit einer Konzentration von 1 M Harnstoff verwendet. Die temperatur- und druckabhängigen Kinetiken der G-zu-F-Transformation in Gegenwart von Harnstoff sind in Abbildung 4.20 a und b dargestellt. Der drastische Einfluss von Harnstoff auf den Polymerisationsprozess ist leicht ersichtlich: Bei Atmosphärendruck und einer Temperatur von 10 °C finden keinerlei Änderungen der Fluoreszenzintensität statt, was darauf hindeutet, dass der Nukleationsprozess innerhalb des gemessenen Zeitintervalls nicht einsetzt (vgl. Abb. 4.14 a). Erst bei höheren

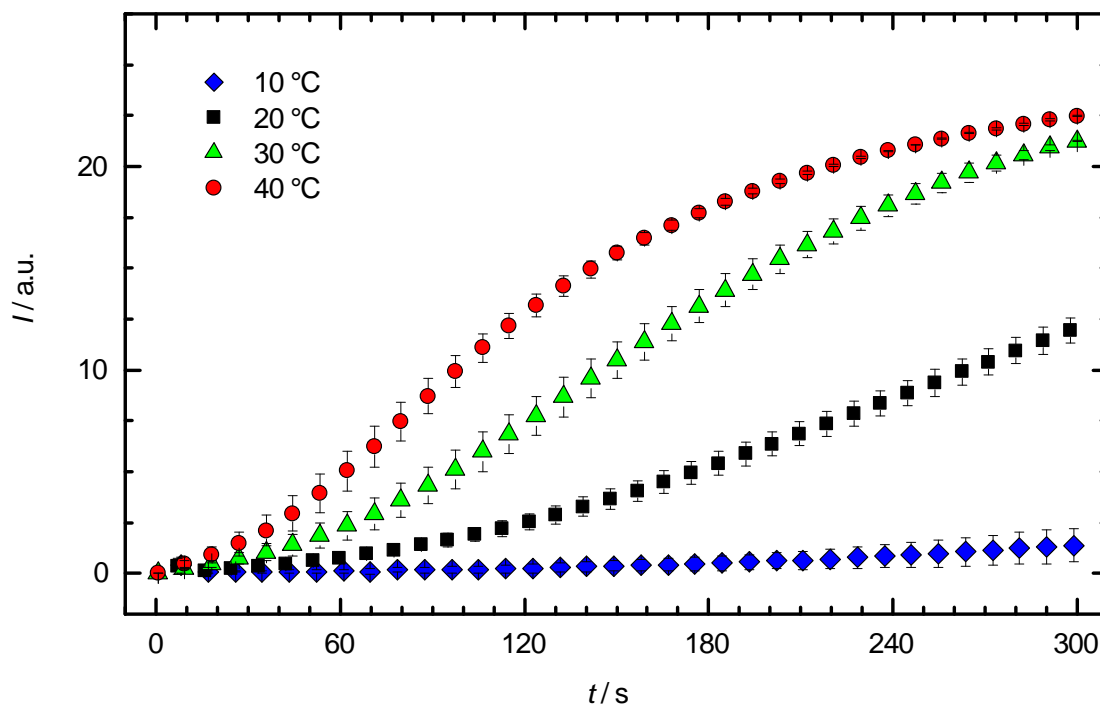


**Abbildung 4.20:** Temperatur- (a) und Druckeffekt (b) auf die Polymerisationskinetik von  $9.2\mu\text{M}$  Aktin in Gegenwart von  $1\text{ M}$  Harnstoff. Alle druckabhängigen Messungen wurden bei einer Temperatur von  $20\text{ °C}$  durchgeführt.

Temperaturen, ab  $20\text{ °C}$ , ist ein leichter Anstieg der Fluoreszenzintensität zu erkennen, der wahrscheinlich auf das Einsetzen der Nukleationsreaktion zurückzuführen ist. Dar-

in begründet, dass 1 M Harnstoff bei einer Temperatur von 20 °C bereits in der Lage ist die Nukleationsreaktion nahezu komplett zu unterbinden, ist der zusätzliche retardierende Druckeffekt kaum ersichtlich. Die sehr langsame Assemblierung von Aktin in Gegenwart von 1 M Harnstoff erlaubt keine Bestimmung von kinetischen Konstanten.

Es ist bereits sehr gut erforscht, dass hohe Konzentrationen an Harnstoff zur Denaturierung von Proteinen führen, da Harnstoff intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Proteinrückgrats unterbinden kann. Die generell akzeptierte Begründung hierfür ist die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Harnstoff und dem Proteinrückgrat und polaren Proteinseitenketten.<sup>[119,121,235]</sup> Die Ausprägung dieser Wechselwirkungen führt letztendlich zu einer präferentiellen Interaktion mit der größeren Oberfläche der entfalteten Proteinkonformation, die zugänglich für das Solvens ist.<sup>[206]</sup> In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die durch Harnstoff bedingten Effekte auf Strukturen innerhalb des Proteins ebenso auf der Ebene der Protein-Protein-Wechselwirkungen vorliegen. Bereits eine moderate Konzentration von 1 M Harnstoff führte dazu, dass die Polymerisationsreaktion von Aktin drastisch



**Abbildung 4.21:** Temperatureffekt auf die Polymerisationskinetik von 9.2 µM Aktin in Gegenwart von 1 M TMAO und 1 M Harnstoff.

beeinträchtigt wurde. Vermutlich kommt es bereits, bevor die Reaktion induziert wird, zu einer partiellen Entfaltung der Aktinmonomere in der Lösung, wodurch eine Retardierung der Lag-Phase auftritt. Um den entgegenwirkenden Effekt von TMAO und Harnstoff zu studieren, wurden äquimolare Konzentrationen beider Cosolventien eingesetzt (Abb. 4.21). Vergleicht man die Kinetiken des Polymerisationsprozesses von Aktin in Ab- (Abb. 4.14 a) und Anwesenheit (Abb. 4.21) von 1 M TMAO und 1 M Harnstoff wird ersichtlich, dass es bei diesem Konzentrationsverhältnis für die  $\text{Mg}^{2+}$ -induzierte Reaktion zu einer nahezu vollständigen Kompensation der Effekte beider Cosolventien kommt. Die ermittelten Kinetiken sind nur geringfügig langsamer als ohne den Zusatz der beiden Cosolventien. Werden also 1 M Harnstoff zu Lösungen von 1 M TMAO zugesetzt, wird der beschleunigende Effekt von TMAO wieder verlangsamt und vice versa, in guter Übereinstimmung mit vorhandenen Literaturdaten.<sup>[117,213]</sup> Durch die Ermittlung der Nukleationsgeschwindigkeitskonstanten und Auftragung gegen die entsprechende Temperatur lässt sich die Aktivierungsenergie  $E_a$  ermitteln. Mit einem Wert von  $113 \pm 14 \text{ kJ mol}^{-1}$  liegt diese zwischen den ermittelten Werten der Aktinpolymerisation in Gegenwart von 1 M TMAO und ohne die Zugabe von Cosolventien (Abb. 4.18), was den kompensatorischen Effekt der beiden Osmolyte widerspiegelt.

### 4.3.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Polymerisationsprozess von Aktin eine hohe Sensitivität gegenüber der Temperatur, dem Drucks oder der Gegenwart von Cosolventien aufweist. Dem Polymerisationsprozess von G- zu F-Aktin können die in Abbildung 4.1 dargestellten Prozesse, mit den zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten (Tab. 4.2), zugrunde gelegt werden. Wie bereits von Zimmerle et al. beschrieben, wird im Vergleich zu allen beteiligten Reaktionsprozessen der Schritt der Assemblierung von polymerisations-kompetenten Nuklei drastisch durch Temperaturveränderungen beeinflusst.<sup>[232]</sup> Zu demselben Ergebnis kommt auch diese Studie. Für Veränderungen des Drucks wurde ebenfalls eine sehr hohe Sensitivität des Nukleationsprozesses im Vergleich zu allen weiteren beteiligten Prozessen an der G-zu-F-Transformation gefunden. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit der Effekt von Cosolventien in Abhängigkeit der Temperatur nachgewiesen werden. So wird die Aktivierungsenergie  $E_a$  des Nukleati-

onsprozesses von Aktin in Gegenwart von 1 M TMAO um ~40 % reduziert. In Gegenwart von 1 M Harnstoff hingegen kam es im Temperaturintervall zwischen 10 und 40 °C nicht mehr zur Lag-Phase der Reaktion und somit war die Bestimmung und Auswertung von kinetischen Konstanten nicht möglich. Des Weiteren konnte in dieser Studie der retardierende Effekt hoher Drücke auf die Polymerisationskinetik dargestellt werden. Die Nukleationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{\text{SNUC}}$  sinkt mit Anstieg des Drucks auf 1 kbar um zwei Größenordnungen. Dies entspricht einem positiven Aktivierungsvolumen  $\Delta V^\ddagger$  von 104 mL mol<sup>-1</sup>. Da bekannt ist, dass Volumenänderungen maßgeblich durch Hydratations- und Packungsänderungen erfolgen, gibt die Bestimmung des Aktivierungsvolumens Informationen über den Übergangszustand. Die Zusammenlagerung von Aktinprotomeren beruht zu einem großen Teil auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Protomeren.<sup>[79,159]</sup> An diesen Kontaktstellen könnten somit, während der Selbstassemblierung der Nuklei, Hohlräume entstehen und mit einer zusätzlichen Freisetzung von Hydratations-Wassermolekülen einhergehend, die während der Bildung der Nuklei auftritt, steigt das Gesamtvolumen an und führt letztendlich zu einem positiven Aktivierungsvolumen. Der natürliche Osmolyt TMAO wird in Zellen von Tiefseeorganismen akkumuliert und kann Proteinstrukturen gegen hohe Temperaturen und Drücke stabilisieren.<sup>[113,119,121,205]</sup> In Tiefseehabitaten können Drücke bis zu etwa 1 kbar auftreten und die dort lebenden Organismen sind in der Lage, diesen extremen Umweltbedingungen standzuhalten. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass TMAO dem retardierenden Effekt hoher Drücke auf den Polymerisationsprozess effizient entgegenwirkt. So wird die druckinduzierte Verlangsamung der Nukleationsreaktion in Gegenwart von 1 M TMAO mit einem Faktor ~2-3 kompensiert. Der Vergleich der Reaktionskinetiken bei einem Druck von 1-2000 bar in Ab- und Anwesenheit des Osmolytes lässt leicht den beschleunigenden Effekt erkennen. Diese Auswirkung manifestiert sich ebenfalls in einem um ~20 % reduzierten Aktivierungsvolumen  $\Delta V^\ddagger$ , im Vergleich zur Reaktion ohne Zugabe des Osmolyts. Es kommt also in Gegenwart von TMAO zu einem kompakteren Übergangszustand der Nukleationsreaktion. Der Einfluss der chaotropen Substanz Harnstoff führte selbst bei moderaten Konzentrationen zu einer drastischen Retardierung des gesamten Polymerisationsprozesses von Aktin. Darin begründet war eine Quantifizierung und Analyse der Effekte von Harnstoff auf kinetische Konstanten

der Reaktion nicht möglich. In weiteren Experimenten konnte allerdings der entgegenwirkende Effekt von TMAO dargestellt werden. Bei äquimolaren Mischungen von TMAO und Harnstoff mit einer Konzentration von 1 M wurden sehr ähnliche Verläufe im Vergleich zur Kinetik ohne die Zugabe des Cosolventien der  $\text{Mg}^{2+}$ -induzierten Polymerisationskinetiken gefunden. Letztendlich ist TMAO nicht nur im Stande der retardierenden Wirkung der chaotropen Substanz Harnstoff entgegenzuwirken, sondern auch dem retardierenden Effekt hoher Drücke auf die G-zu-F-Transformation. Diese Eigenschaft basiert wahrscheinlich auf der stabilisierenden Wirkung von TMAO auf hydrophobe Wechselwirkungen, die durch hohe Drücke geschwächt werden und deren Ausbildung eine wichtige Rolle bei der Polymerisationsreaktion von Aktin spielen.



---

# Literaturverzeichnis

- [1] A. Koschinsky, D. Garbe-Schönberg, S. Sander, K. Schmidt, H. H. Gennerich, and H. Strauss, *Geology*, 2008, **36**(8), 615–618.
- [2] C. Kato, L. Li, Y. Nogi, Y. Nakamura, J. Tamaoka, and K. Horikoshi, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**(4), 1510–1513.
- [3] K. Kashefi and D. R. Lovley, *Science*, 2003, **301**(5635), 934.
- [4] W. Martin and M. J. Russell, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2003, **358**(1429), 59–85.
- [5] P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus, and G. N. Somero, *Science*, 1982, **217**(4566), 1214–1222.
- [6] P. H. Yancey, *J. Exp. Biol.*, 2005, **208**(Pt 15), 2819–2830.
- [7] T. D. Pollard, *Biophys. J.*, 1986, **49**(1), 149–151.
- [8] R. J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.*, 2001, **26**(10), 597–604.
- [9] F. Abe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007, **71**(10), 2347–2357.
- [10] N. Rivalain, J. Roquain, and G. Demazeau, *Biotechnol. Adv.*, 2010, **28**(6), 659–672.
- [11] R. Winter, D. Lopes, S. Grudzielanek, and K. Vogtt, *J. Non-Equilib. Thermodyn.*, 2007, **32**(1), 41–97.
- [12] S. Kapoor, G. Triola, I. R. Vetter, M. Erilkamp, H. Waldmann, and R. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, **109**(2), 460–465.

- [13] J. L. Silva, A. C. Oliveira, T. C. R. G. Vieira, G. A. P. de Oliveira, M. C. Suarez, and D. Foguel, *Chem. Rev.*, 2014, **114**(14), 7239–7267.
- [14] M. Guharoy, B. Szabo, S. C. Martos, S. Kosol, and P. Tompa, *Cytoskeleton*, 2013, **70**(10), 550–571.
- [15] E. Clarkson, C. F. Costa, and L. M. Machesky, *J. Pathol.*, 2004, **204**(4), 407–417.
- [16] J. C. Sparrow, K. J. Nowak, H. J. Durling, A. H. Beggs, C. Wallgren-Pettersson, N. Romero, I. Nonaka, and N. G. Laing, *Neuromuscul. Disord.*, 2003, **13**(7-8), 519–531.
- [17] D. Sanoudou and A. H. Beggs, *Trends Mol. Med.*, 2001, **7**(8), 362–368.
- [18] C. Darwin, *On The Origin of Species by Means of Natural Selection*, Murray, John, 1859.
- [19] D. L. Theobald, *Nature*, 2010, **465**(7295), 219–222.
- [20] H. P. Erickson, *Bioessays*, 2007, **29**(7), 668–677.
- [21] W. D. Halliburton, *J. Physiol.*, 1887, **8**(3-4), 133–202.
- [22] F. B. Straub, *Stud. Szeged*, 1942, **2**, 1–15.
- [23] I. Fujiwara, D. Vavylonis, and T. D. Pollard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**(21), 8827–8832.
- [24] L. S. Tobacman, S. L. Brenner, and E. D. Korn, *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**(14), 8806–8812.
- [25] T. Oda, M. Iwasa, T. Aihara, Y. Maéda, and A. Narita, *Nature*, 2009, **457**(7228), 441–445.
- [26] C. W. Pak, K. C. Flynn, and J. R. Bamberg, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2008, **9**(2), 136–147.
- [27] G. Hild, B. Bugyi, and M. Nyitrai, *Cytoskeleton*, 2010, **67**(10), 609–29.

- 
- [28] O. D. Harwell, M. L. Sweeney, and F. H. Kirkpatrick, *J. Biol. Chem.*, 1980, **255**(3), 1210–1220.
- [29] D. Strehle, J. Schnauss, C. Heussinger, J. Alvarado, M. Bathe, J. Käs, and B. Gentry, *Eur. Biophys. J.*, 2011, **40**(1), 93–101.
- [30] J. R. Bartles, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000, **12**(1), 72–78.
- [31] F. Huber, J. Schnauß, S. Rönicke, P. Rauch, K. Müller, C. Fütterer, and J. Käs, *Adv. Phys.*, 2013, **62**(1), 1–112.
- [32] X. Qian, D. D. Mruk, Y. H. Cheng, E. I. Tang, D. Han, W. M. Lee, E. W. P. Wong, and C. Y. Cheng, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2014, **30**, 75–85.
- [33] N. Wakai, K. Takemura, T. Morita, and A. Kitao, *PLoS One*, 2014, **9**(1), e85852.
- [34] K. C. Holmes, *Nature*, 2009, **457**, 389–390.
- [35] E. D. Korn, *Physiol. Rev.*, 1982, **62**(2), 672–737.
- [36] J. C. Sparrow and N. G. Laing in *Actin-Binding Proteins Dis.*, ed. C. dos Remedios and D. Chhabra; Springer, New York, 8 ed., 2008; chapter 2.
- [37] C. Chaponnier and G. Gabbiani, *J Pathol.*, 2004, **204**(4), 386–395.
- [38] P. Sheterline, J. Clayton, and J. Sparrow, *Protein Profile*, 1995, **2**(1), 1–103.
- [39] W. Kabsch, H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, and K. C. Holmes, *Nature*, 1990, **347**(6288), 37–44.
- [40] A. Sagar, N. Peddada, A. k. Solanki, V. Choudhary, R. Garg, and Ashish, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, **435**(4), 740–744.
- [41] P. A. Rubenstein, *Bioessays.*, 1990, **12**(7), 309–315.
- [42] I. M. Herman, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1993, **5**(1), 48–55.
- [43] W. Kabsch and K. C. Holmes, *FASEB J.*, 1995, **9**(2), 167–174.
- [44] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.

- [45] H. Wang, R. C. Robinson, and L. D. Burtnick, *Cytoskeleton*, 2010, **67**(7), 456–65.
- [46] J. E. Estes, L. A. Selden, H. J. Kinosian, and L. C. Gershman, *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 1992, **13**(3), 272–84.
- [47] L. C. Gershman, L. A. Selden, and J. E. Estes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **135**(2), 607–614.
- [48] E. M. De La Cruz and T. D. Pollard, *Biochemistry*, 1995, **34**(16), 5452–5461.
- [49] P. Graceffa and R. Dominguez, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**(36), 34172–34180.
- [50] A. Orlova and E. H. Egelman, *J. Mol. Biol.*, 1993, **232**(2), 334–341.
- [51] B. Gaszner, M. Nyitrai, N. Hartvig, T. Köszei, B. Somogyi, and J. Belágyi, *Biochemistry*, 1999, **38**(39), 12885–12892.
- [52] M. Nyitrai, G. Hild, Z. Lakos, and B. Somogyi, *Biophys. J.*, 1998, **74**(5), 2474–2481.
- [53] A. Orlova and E. H. Egelman, *J. Mol. Biol.*, 1995, **245**(5), 582–597.
- [54] A. Orlova, E. Prochniewicz, and E. H. Egelman, *J. Mol. Biol.*, 1995, **245**(5), 598–607.
- [55] I. V. Dedova, O. P. Nikolaeva, D. Safer, E. M. De La Cruz, and C. G. dos Remedios, *Biophys. J.*, 2006, **90**(3), 985–992.
- [56] S. Khaitlina and H. Hinssen, *Biophys. J.*, 1997, **73**(2), 929–937.
- [57] M. Morimatsu, Y. Togashi, S. Nishikawa, M. Sugawa, A. H. Iwane, and T. Yanagida, *PLoS One*, 2012, **7**(11), e45864.
- [58] M. Iwasa, K. Maeda, A. Narita, Y. Maéda, and T. Oda, July , 2008, **283**(30), 21045–21053.
- [59] M. Miki, P. Wahl, and J.-C. Auchet, *Biochemistry*, 1982, **21**(15), 3661–3665.
- [60] L. S. Tobacman and E. D. Korn, *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**(5), 3207–3214.

- 
- [61] J. A. Cooper, E. L. Buhle Jr., S. B. Walker, T. Y. Tsong, and T. D. Pollard, April , 1983, **22**(9), 2193–2202.
- [62] C. Frieden, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 1985, **14**, 189–210.
- [63] M.-F. Carlier, *Adv. Biophys.*, 1990, **26**, 51–73.
- [64] T. D. Pollard, *J. Cell. Biol.*, 1986, **103**(6), 2747–2754.
- [65] T. D. Pollard and J. A. Cooper, *Science (80-. )*, 2009, **326**(5957), 1208–1212.
- [66] A. Wegner, *J. Mol. Biol.*, 1976, **108**(1), 139–150.
- [67] J. R. Kuhn and T. D. Pollard, *Biophys. J.*, 2005, **88**(2), 1387–1402.
- [68] M. Bindschadler, E. A. Osborn, C. F. Dewey Jr., and J. L. McGrath, *Biophys. J.*, 2004, **86**(5), 2720–2739.
- [69] G. Isenberg, U. Aebi, and T. D. Pollard, *Nature*, 1980, **288**(5790), 455–459.
- [70] H. L. Yin, J. H. Hartwig, K. Maruyamas, and T. P. Stossel, *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**(18), 9693–9697.
- [71] S. G. Heiss and J. A. Cooper, *Biochemistry*, 1991, **30**(36), 8753–8758.
- [72] P. A. Janmey and T. P. Stossel, *Nature*, 1987, **325**(6102), 362–364.
- [73] H. L. Yin and T. P. Stossel, *Nature*, 1979, **281**(5732), 583–586.
- [74] R. D. Mullins, J. A. Heuser, and T. D. Pollard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1998, **95**(11), 6181–6186.
- [75] T. D. Pollard, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2007, **36**, 451–477.
- [76] A. A. Halavatyi, P. V. Nazarov, S. Medves, M. van Troys, C. Ampe, M. Yatskou, E. Friederich, and M. van Troys, 2009.
- [77] T. Fujii, A. H. Iwane, T. Yanagida, and K. Namba, October , 2010, **467**(7316), 724–728.

- [78] K. Murakami, T. Yasunaga, T. Q. P. Noguchi, Y. Gomibuchi, K. X. Ngo, T. Q. P. Uyeda, and T. Wakabayashi, *Cell*, 2010, **143**(2), 275–287.
- [79] J. von der Ecken, M. Müller, W. Lehman, D. J. Manstein, P. a. Penczek, and S. Raunser, *Nature*, 2014, **519**(7541), 114–117.
- [80] T. D. Pollard and G. G. Borisy, *Cell*, 2003, **112**(4), 453–465.
- [81] T. T. Falzone, M. Lenz, D. R. Kovar, and M. L. Gardel, *Nat. Commun.*, 2012, **3**, 861.
- [82] E. S. Chhabra and H. N. Higgs, *Nat. Cell. Biol.*, 2007, **9**(10), 1110–1121.
- [83] H. Shin and G. M. Grason, *Phys. Rev. E*, 2010, **82**(5), 051919(15).
- [84] W. M. Roberts, J. Howard, and a. J. Hudspeth, *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 1988, **4**, 63–92.
- [85] G. C. L. Wong, A. Lin, J. X. Tang, Y. Li, P. A. Janmey, and C. R. Safinya, *Phys Rev Lett.*, 2003, **91**(1), 018103.
- [86] P. W. Bridgman, *The Physics of High Pressure*, G. Bell, London, 1949.
- [87] S.-Y. Sheu, D.-Y. Yang, H. L. Selzle, and E. W. Schlag, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2003, **100**(22), 12683–12687.
- [88] S. B. Prusiner, *Sci. Am.*, 2004, **291**(1), 86–93.
- [89] X. Xiao, J. Yuan, L. Qing, I. Cali, J. Mikol, M.-B. Delisle, E. Uro-Coste, L. Zeng, M. Abouelsaad, D. Gazgalis, M. C. Martines, G.-X. Wang, P. Brown, J. W. Ironsied, P. Gambetti, Q. Kong, and W.-Q. Zou, *J. Clin. Cell. Immunol.*, 2014, **5**(4), pii: 240.
- [90] J. N. Onuchic and P. G. Wolynes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2004, **14**(1), 70–75.
- [91] J. N. Onuchic, H. Nymeyer, A. E. García, J. Chahine, and N. D. Socci, *Adv. Protein Chem.*, 2000, **53**, 87–152.

- 
- [92] J. N. Onuchic, N. D. Socci, Z. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes, *Fold Des.*, 1996, **1**(6), 441–450.
- [93] L. J. Lapidus, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2013, **23**(1), 30–35.
- [94] P. G. Wolynes, *Biochimie*, 2014, **S0300-9084**(14), 00389–7.
- [95] J. J. Portman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2010, **20**(1), 11–15.
- [96] E. Kloss, N. Courtemanche, and D. Barrick, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, **469**(1), 83–99.
- [97] D. Thirumalai, E. P. O’Brien, G. Morrison, and C. Hyeon, *Annu. Rev. Biophys.*, 2010, **39**, 159–183.
- [98] S. A. Hawley, *Biochemistry*, 1971, **10**(13), 2436–2442.
- [99] C. Scharnagl, M. Reif, and J. Friedrich, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2005, **1749**(2), 187–213.
- [100] G. W. Robinson and C. H. Cho, *Biophys. J.*, 1999, **77**(6), 3311–3318.
- [101] C. M. Dobson, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2004, **15**(1), 3–16.
- [102] C. Balny and P. Masson, November , 1993, **9**(4), 611–628.
- [103] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, and P. F. McMillan, *Rev. Miner. Geochem.*, 2013, **75**(1), 607–648.
- [104] K. Heremans, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2005, **38**(8), 1157–1165.
- [105] F. Meersman, L. Smeller, and K. Heremans, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2006, **1764**(3), 346–354.
- [106] K. J. Frye and C. A. Royer, *Protein Sci.*, 1998, **7**(10), 2217–2222.
- [107] C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2002, **1595**(1-2), 201–209.
- [108] N. Taulier and T. V. Chalikian, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2002, **1595**(1-2), 48–70.

- [109] J. Roche, J. A. Caro, D. R. Norberto, P. Barthe, C. Roumestand, J. L. Schlessman, A. E. Garcia, B. García-Moreno E., and C. A. Royer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**(18), 6945–6950.
- [110] T. V. Chalikian, January , 2003, **32**, 207–235.
- [111] M. Gross and R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.*, 1994, **221**(2), 617–630.
- [112] D. W. Bolen and I. V. Baskakov, *J. Mol. Biol.*, 2001, **310**(5), 955–963.
- [113] S. S. Cho, G. Reddy, J. E. Straub, and D. Thirumalai, *J. Phys. Chem. B.*, 2011, **115**(45), 13401–13407.
- [114] J. Ma, I. M. Pazos, and F. Gai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2014, **111**(23), 8476–8481.
- [115] C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, M. Tolan, C. Royer, and R. Winter, December , 2008, **9**(18), 2809–2815.
- [116] D.-S. Yang, C. M. Yip, T. H. J. Huang, A. Chakrabartty, and P. E. Fraser, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**(46), 32970–32974.
- [117] K. Hatori, T. Iwasaki, and R. Wada, *Biophys. Chem.*, 2014, **193-194**, 20–26.
- [118] Q. Zou, B. J. Bennion, V. Daggett, and K. P. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**(7), 1192–1202.
- [119] D. W. Bolen and G. D. Rose, *Annu. Rev. Biochem.*, 2008, **77**, 339–362.
- [120] M. Auton and D. W. Bolen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2005, **102**(42), 15065–15068.
- [121] D. R. Canchi and A. E. García, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2013, **64**, 273–293.
- [122] D. Horinek and R. R. Netz, *J. Phys. Chem. A.*, 2011, **115**(23), 6125–6136.
- [123] S. Lee, Y. L. Shek, and T. V. Chalikian, *Biopolymers*, 2010, **93**(10), 866–879.
- [124] E. J. Guinn, L. M. Pegram, M. W. Capp, M. N. Pollock, and M. T. Record, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, **108**(41), 16932–16937.



- 
- [125] A. P. Minton, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**(14), 10577–10580.
- [126] H.-X. Zhou, G. Rivas, and A. P. Minton, *Annu. Rev. Biophys.*, 2008, **37**, 375–397.
- [127] G. Yamin, L. a. Munishkina, M. a. Karymov, Y. L. Lyubchenko, V. N. Uversky, and A. L. Fink, *Biochemistry*, 2005, **44**(25), 9096–9107.
- [128] M. del Álamo, G. Rivas, and M. G. Mateu, *J. Virol.*, 2005, **79**(22), 14271–14281.
- [129] Y. Zhai and R. Winter, *ChemPhysChem*, 2013, **14**(2), 386–393.
- [130] M. Erilkamp, S. Grobelny, and R. Winter, *Phys Chem Chem Phys.*, 2014, **16**(13), 5965–5976.
- [131] A. P. Minton, *Biophys. J.*, 2000, **78**(1), 101–109.
- [132] V. Lullien-Pellerin and C. Balny, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2002, **3**(3), 209–221.
- [133] R. Lange and C. Balny, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2002, **1595**(1-2), 80–93.
- [134] N. J. Brooks, B. L. L. E. Gauthe, N. J. Terrill, S. E. Rogers, R. H. Templer, O. Ces, and J. M. Seddon, *Rev. Sci. Instrum.*, 2010, **81**(6), 064103.
- [135] M. Subirade, F. Loupil, A.-F. Allain, and P. Paquin, *Int.. Dairy J.*, 1998, **8**(2), 135–140.
- [136] Y. Taniguchi, *J. Mol. Catal.*, 1988, **47**(2-3), 323–334.
- [137] C. E. Munte, M. B. Erlach, W. Kremer, J. Koehler, and H. R. Kalbitzer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**(34), 8943–8947.
- [138] S. Kapoor, A. Werkmüller, R. S. Goody, H. Waldmann, and R. Winter, April , 2013, **135**(16), 6149–6156.
- [139] Y.-S. Kim, T. W. Randolph, F. J. Stevens, and J. F. Carpenter, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**(30), 27240–27246.

- [140] J. B. Rouget, M. A. Schroer, C. Jeworrek, M. Pühse, J. L. Saldana, Y. Bessin, M. Tolan, D. Barrick, R. Winter, and C. A. Royer, *Biophys. J.*, 2010, **98**(11), 2712–2721.
- [141] V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson, and C. Balny, *Trends Biotechnol.*, 1994, **12**(12), 493–501.
- [142] A. Drljaca, C. D. Hubbard, R. van Eldik, T. Asano, M. V. Basilevsky, and W. J. le Noble, *Chem. Rev.*, 1998, **98**(6), 2167–2290.
- [143] P. M. Oger, I. Daniel, and A. Picard, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1764**(3), 434–442.
- [144] M. Nishiyama, Y. Kimura, Y. Nishiyama, and M. Terazima, *Biophys. J.*, 2009, **96**(3), 1142–1150.
- [145] P. T. T. Wong and D. J. Moffatt, *Appl. Spectrosc.*, 1989, **43**(7), 1279–1281.
- [146] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, *Nat. Methods*, 2012, **9**(7), 671–675.
- [147] B. O. Flynn and M. W. Davidson, TE300 Microscope Optical Pathways.
- [148] C. E. Weir, E. R. Lippincott, A. Van Valkenburg, and E. N. Bunting, *J. Reasearch Natl. Bur. Stand. - A. Phys. Chem.*, 1959, **63A**(1), 55–62.
- [149] A. Picard, P. M. Oger, I. Daniel, H. Cardon, G. Montagnac, and J.-C. Chervin, *J. Appl. Phys.*, 2006, **100**(3), 034915.
- [150] R. A. Forman, G. J. Piermarini, J. D. Barnett, and S. Block, April , 1972, **176**(4032), 284–285.
- [151] J. Chervin, C. Power, and A. Polian, *Int. J. High Press. Res.*, 2005, **25**(2), 97–105.
- [152] H. Keller, M. Lorizate, and P. Schwille, *ChemPhysChem*, 2009, **10**(16), 2805–2812.
- [153] J. Seeliger, N. Erwin, C. Rosin, M. Kahse, K. Weise, and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**(11), 7507–7513.

- 
- [154] M. Choukroun and O. Grasset, *J. Chem. Phys.*, 2007, **127**, 124506.
- [155] I. Daniel, P. Oger, and R. Winter, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**(10), 858–875.
- [156] G. Panick, R. Malessa, R. Winter, G. Rapp, K. J. Frye, and C. A. Royer, *J. Mol. Biol.*, 1998, **275**(2), 389–402.
- [157] R. Winter and C. Jeworrek, *Soft Matter*, 2009, **5**(17), 3157–3173.
- [158] Y. Ikeuchi, A. Suzuki, T. Oota, K. Hagiwara, R. Tatsumi, T. Ito, and C. Balny, *Eur. J. Biochem.*, 2002, **269**(1), 364–371.
- [159] R. R. Swezey and G. N. Somero, *Biochemistry*, 1985, **24**(4), 852–860.
- [160] T. Ikkai, T. Ooi, and H. Noguchi, June , 1966, **152**(3730), 1756–1757.
- [161] T. Ikkai and T. Ooi, *Biochemistry*, 1966, **5**(5), 1551–1560.
- [162] M. Kikumoto, Y. Tamura, A. Ooi, and K. Mihashi, May , 2003, **133**(5), 687–691.
- [163] M. Sato, H. Kobori, S. A. Ishijima, Z. H. Feng, K. Hamada, S. Shimada, and M. Osumi, *Cell Struct. Funct.*, 1996, **21**(3), 167–174.
- [164] T. Kawarai, S. Arai, S. Furukawa, H. Ogihara, and M. Yamasaki, *J. Biosci. Bioeng.*, 2006, **101**(6), 515–518.
- [165] S. Shimada, M. Andou, N. Naito, N. Yamada, M. Osumi, and R. Hayashi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, **40**(1), 123–131.
- [166] H. Kobori, M. Sato, A. Tameike, K. Hamada, S. Shimada, and M. Osumi, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1995, **132**(3), 253–258.
- [167] F. Abe and K. Horikoshi, *Mol. Cell. Biol.*, 2000, **20**(21), 8093–8102.
- [168] B. Bourns, S. Franklin, L. Cassimeris, and E. D. Salmon, *Cell Motil. Cytoskeleton*, 1988, **10**(3), 380–390.
- [169] S. N. Timasheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**(15), 9721–9726.

- [170] P. H. Yancey, A. L. Fyfe-Johnson, R. H. Kelly, V. P. Walker, and M. T. Aun, *J. Exp. Zool.*, 2001, **289**(3), 172–176.
- [171] C. Rosin, M. Erlkamp, J. von der Ecken, S. Raunser, and R. Winter, *Biophys. J.*, 2014, **107**(12), 2973–2983.
- [172] R. Dominguez and P. Graceffa, *Biophys. J.*, 2003, **85**(4), 2073–2074.
- [173] J. X. Tang and P. A. Janmey, *Biol. Bull.*, 1998, **194**(3), 406–408.
- [174] M. Byler and H. Susi, *Biopolymers*, 1986, **25**(3), 469–487.
- [175] M. Ohi, Y. Li, Y. Cheng, and T. Walz, January , 2004, **6**(1), 23–34.
- [176] T. A. Binkowski, S. Naghibzadeh, and J. Liang, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**(13), 3352–3355.
- [177] H. Edelsbrunner, M. Facello, and J. Liang, *Discret. Appl. Math.*, 1998, **88**(1-3), 83–102.
- [178] J. Liang, H. Edelsbrunner, and C. Woodward, *Protein Sci.*, 1998, **7**(9), 1884–1897.
- [179] F. Quirion and C. Gicquaud, *Biochem. J.*, 1993, **295**(Pt 3), 671–672.
- [180] H. Herberhold and R. Winter, *Biochemistry*, 2002, **41**(7), 2396–2401.
- [181] G. Panick, R. Malessa, and R. Winter, *Biochemistry*, 1999, **38**(20), 6512–6519.
- [182] L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, **1595**(1-2), 11–29.
- [183] G. Hummer, S. Garde, A. E. García, M. E. Paulaitis, and L. R. Pratt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, **95**(4), 1552–1555.
- [184] H. Schüler, U. Lindberg, C. E. Schutt, and R. Karlsson, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**(2), 476–486.
- [185] D. Lorinczy, F. Könczöl, B. Gaszner, and J. Belagyi, *Thermochim. Acta*, 1998, **322**(2), 95–100.

- 
- [186] A. Bertazzon, G. H. Tian, A. Lamblin, and T. Y. Tsong, *Biochemistry*, 1990, **29**(1), 291–298.
- [187] A. I. Norman, R. Ivkov, J. G. Forbes, and S. C. Greer, *J. Chem. Phys.*, 2005, **123**(15), 154904.
- [188] N. Suzuki, Y. Tamura, and K. Mihashi, *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, **1292**(2), 265–272.
- [189] D. I. Levitsky, A. V. Pivovarova, V. V. Mikhailova, and O. P. Nikolaeva, September , 2008, **275**(17), 4280–4295.
- [190] C. R. S. Garcia, J. A. Amaral Júnior, P. Abrahamsohn, and S. Verjovski-Almeida, *Eur. J. Biochem.*, 1992, **209**(3), 1005–1011.
- [191] R. Mishra and R. Winter, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2008, **47**(35), 6518–6521.
- [192] C. G. dos Remedios and P. D. J. Moens, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1228**(2-3), 99–124.
- [193] L. Mitra, N. Smolin, R. Ravindra, C. Royer, and R. Winter, March , 2006, **8**(11), 1249–1265.
- [194] Y. Zhai, L. Okoro, A. Cooper, and R. Winter, *Biophys. Chem.*, 2011, **156**(1), 13–23.
- [195] S. Fujiwara, M. Plazanet, and T. Oda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, **431**(3), 542–546.
- [196] D. Paschek and R. Ludwig, *Angew. Chemie*, 2011, **123**(2), 368–370.
- [197] A. T. Da Poian, A. C. Oliveira, L. P. Gaspar, and J. L. Silva, *J. Mol. Biol.*, 1993, **231**(4), 999–1008.
- [198] A. T. Da Poian, J. E. Johnson, and J. L. Silva, *Biochemistry*, 1994, **33**(27), 8339–8346.
- [199] J. A. C. Bispo, C. F. S. Bonafe, I. Joekes, E. A. Martinez, G. B. M. Carvalho, and D. R. Norberto, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**(51), 14817–14828.

- [200] T. D. Pollard, L. Blanchoin, and R. D. Mullins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2000, **29**, 545–576.
- [201] C. Ballestrem, B. Wehrle-Haller, and B. a. Imhof, *J. Cell Sci.*, 1998, **111**(Pt 12), 1649–1658.
- [202] H. Herberhold and R. Winter, *J. Phys. Condens. Matter*, 2002, **14**(44), 11485–11488.
- [203] B. Moeser and D. Horinek, *J. Phys. Chem. B*, 2014, **118**(1), 107–114.
- [204] B. J. Bennion and V. Daggett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**(17), 6433–6438.
- [205] D. R. Canchi, P. Jayasimha, D. C. Rau, G. I. Makhatadze, and A. E. Garcia, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**(40), 12095–12104.
- [206] S. N. Timasheff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1993, **22**, 67–97.
- [207] M. V. Athawale, J. S. Dordick, and S. Garde, *Biophys. J.*, 2005, **89**(2), 858–866.
- [208] S. Cinar and C. Czeslik, *Colloids Surf. B Biointerfaces.*, 2015, (<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.043>).
- [209] K. Akasaka, *Chem. Rev.*, 2006, **106**(5), 1814–1835.
- [210] E. Goormaghtigh, J.-M. Ruyschaert, and V. Raussens, *Biophys. J.*, 2006, **90**(8), 2946–2957.
- [211] R. A. Lindner and G. B. Ralston, *May*, 1997, **66**(1), 57–66.
- [212] R. L. Tellam, M. J. Sculley, L. W. Nichol, and P. R. Wills, *Biochem. J.*, 1983, **213**(3), 651–659.
- [213] D. L. Sackett, *Am. J. Physiol.*, 1997, **273**(2 Pt 2), R669–676.
- [214] G. Bains, A. B. Patel, and V. Narayanaswami, *Molecules*, 2011, **16**(9), 7909–7935.
- [215] T.-I. Lin and R. M. Dowben, *Biophys. Chem.*, 1982, **15**(4), 289–298.

- 
- [216] C. Rosin, P. H. Schummel, and R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **17**(13), 8330–8337.
- [217] J. A. Cooper and T. D. Pollard, *Methods Enzymol.*, 1982, **85**, 182–210.
- [218] S. Samarin, S. Romero, C. Kocks, D. Didry, D. Pantaloni, and M.-F. Carlier, *J. Cell Biol.*, 2003, **163**(1), 131–142.
- [219] J. Fass, C. Pak, J. Bamburg, and A. Mogilner, *J. Theor. Biol.*, 2009, **252**(1), 173–183.
- [220] L. Blanchoin and T. D. Pollard, *Biochemistry*, 2002, **41**(2), 597–602.
- [221] A. Mogilner and L. Edelstein-Keshet, *Biophys. J.*, 2002, **83**(3), 1237–1258.
- [222] E. M. Bonder, D. J. Fishkind, and M. S. Mooseker, September , 1983, **34**(2), 491–501.
- [223] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3 ed., 2006.
- [224] F. Lanni and B. R. Ware, *Biophys. J.*, 1984, **46**(1), 97–110.
- [225] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, 1959, **14**, 1–63.
- [226] A. P. Minton, *Biopolymers*, 1981, **20**(10), 2093–2120.
- [227] A. P. Minton, *Mol. Cell. Biochem.*, 1983, **55**(2), 119–140.
- [228] E. Schneck, D. Horinek, and R. R. Netz, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**(28), 8310–8321.
- [229] J. Yoon, D. Thirumalai, and C. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**(32), 12112–12121.
- [230] C. Rosin, K. Estel, J. Hälker, and R. Winter, *ChemPhysChem*, 2015, **16**(7), 1379–1385.
- [231] P. Bugnon, G. Laurenczy, Y. Ducommun, P.-Y. Sauvageat, A. E. Merbach, R. Ith, R. Tschanz, M. Doludda, R. Bergbauer, and E. Grell, *Anal. Chem.*, 1996, **68**(17), 3045–3049.

- [232] C. T. Zimmerle and C. Frieden, *Biochemistry*, 1986, **25**(21), 6432–6438.
- [233] J. L. Silva, D. Foguel, and C. A. Royer, *TRENDS Biochem. Sci.*, 2001, **26**(10), 612–618.
- [234] K. Heremans and L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1386**(2), 353–370.
- [235] D. R. Canchi, D. Paschek, and A. E. García, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**(7), 2338–2344.



## Publikationsliste

- [1] Rosin, C., K. Estel, J. Hälker, and R. Winter. **2015**. Combined Effects of Temperature, Pressure, and Co-Solvents on the Polymerization Kinetics of Actin. *ChemPhysChem*. 16(7): 1379-1385.
- [2] Rosin, C., M. Erlkamp, J. von der Ecken, S. Raunser, and R. Winter. **2014**. Exploring the Stability Limits of Actin and its Suprastructures. *Biophys. J.* 107(12): 2973-2983.
- [3] Rosin, C., P.H. Schummel, and R. Winter. **2014**. Cosolvent and crowding effects on the polymerization kinetics of actin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17(13): 8330-8337.
- [4] Schuabb, C., M. Berghaus, C. Rosin, and R. Winter. **2015**. Exploring the Free Energy and Conformational Landscape of tRNA at High Temperature and Pressure. *ChemPhysChem*. 16(1): 138-146.
- [5] Seeliger, J., N. Erwin, C. Rosin, M. Kahse, K. Weise, and R. Winter. **2015**. Exploring the structure and phase behavior of plasma membrane vesicles under extreme environmental conditions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17(11): 7507-7513.
- [6] Lehnert, M., C. Rosin, W. Knoll, and M. Veith. **2013**. Layer-by-Layer Assembly of a Streptavidin - Fibronectin Multilayer on Biotinylated TiO<sub>X</sub>. *Langmuir*. 29(6): 1732-1737.
- [7] Lehnert, M., M. Gorbahn, C. Rosin, M. Klein, I. Köper, B. Al-Nawas, W. Knoll, and M. Veith. **2011**. Adsorption and conformation behavior of biotinylated fibronectin on streptavidin-modified TiO<sub>X</sub> surfaces studied by SPR and AFM. *Langmuir*. 27(12): 7743-7751.

# Eidesstattliche Versicherung

Name: Christopher Rosin  
Universität: Technische Universität Dortmund  
Fakultät: Chemie und Chemische Biologie

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

## FALTUNGSSTABILITÄT UND ASSEMBLIERUNGSKINETIK

### VON AKTINSTRUKTUREN

BIOPHYSIKALISCHE EINFLÜSSE VON DRUCK, TEMPERATUR UND COSOLVENTIEN

selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

---

Datum, Unterschrift